



SAPIENZA UNIVERSITÀ DI ROMA

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Dipartimento di Chimica



**STRATEGIA ANALITICA PER LA CARATTERIZZAZIONE DEL
PROFILO VITAMINICO LIPOSOLUBILE E CAROTENOIDEO
DEL LATTE DI DIFFERENTI SPECIE ANIMALI
MEDIANTE IFENAZIONE HPLC-DAD-TANDEM MS**

Relatore:

Prof.ssa Alessandra Gentili

Candidata:

Dott.ssa Simona Bellante

Dottorato in Chimica Analitica e dei Sistemi Reali

*In un Paese in cui tutto è in vendita o è un baratto
e tutto è sempre più a basso prezzo,
a tutti coloro che non raccontano di sogni
ma elaborano progetti,
a tutti coloro che hanno come motore non l'orgoglio e l'apparire
ma il senso di responsabilità,
a tutti coloro che sanno indignarsi senza rabbia né retorica.
In un Paese che si va adagiando sulle proprie mediocrità,
a chi si distingue perché conosce la fatica di lavorare e amare con onestà.*

SOMMARIO

SOMMARIO	3
1. INTRODUZIONE	- 7 -
1.2 IL LATTE	- 9 -
1.2.1 COMPOSIZIONE CHIMICA	- 10 -
a. Proteine	- 10 -
b. Lipidi	- 13 -
c. Glucidi	- 15 -
d. Sali minerali	- 16 -
e. Vitamine e carotenoidi	- 17 -
e. Altri costituenti	- 17 -
1.2.2 TIPI DI LATTE	- 18 -
1.2.3 CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE	- 19 -
1.2.4 ANALISI	- 20 -
1.3 LE VITAMINE	- 22 -
1.3.1 LE VITAMINE LIPOSOLUBILI	- 23 -
a. Vitamina D	- 23 -
b. Vitamina E	- 24 -
c. Vitamina K	- 26 -
1.3.2 VITAMINA A	- 28 -
a. Fonti di vitamina A	- 30 -
b. Vitameri A nel latte	- 32 -
c. Stabilità dei vitameri A nel latte	35
1.3.3 I CAROTENOIDI	37
a. Struttura e biosintesi	38
b. Nomenclatura	39
c. Stereochimica	40
d. Proprietà chimico-fisiche ed azione antiossidante	42
e. distribuzione in natura	45
1.4 METABOLISMO DELLA VITAMINA A E DEI CAROTENOIDI	46

a.	Assorbimento	48
b.	Uptake epatico e immagazzinamento della Vitamina A	51
c.	Trasporto plasmatico di retinolo e carotenoidi	51
1.4.1	FATTORI DI CONVERSIONE PER LA VITAMINA A	52
1.4.2	BIODISPONIBILITA'	53
1.5	RUMINANTI	54
1.5.1	APPARATO DIGERENTE	54
1.5.2	PROCESSO DIGESTIVO	57
1.6	STATO DELL'ARTE	61
1.6.1	VITAMINE LIPOSOLUBILI E CAROTENOIDI	61
a.	Procedure estrattive per alimenti di origine animale	61
b.	Metodi cromatografici	62
c.	Metodi cromatografici (LC-DAD, LC-MS) per la determinazione simultanea di vitamine liposolubili e carotenoidi nel latte	64
1.6.2	RETINOIDI	65
a.	metodi analitici	65
b.	metodi analitici per la determinazione dei vitameri A nel latte	68
2.	PARTE SPERIMENTALE	76
2.1	MATERIALI E METODI	76
2.1.1	REAGENTI E PRODOTTI CHIMICI	76
2.1.2	CAMPIONI DI LATTE	81
2.1.3	PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI LAVORO	81
2.1.4	PROCEDURA DI ESTRAZIONE	82
a.	Saponificazione a freddo per vitamine liposolubili e carotenoidi	82
b.	Estrazione diretta per i retinil esteri	83
2.1.5	CROMATOGRAFIA LIQUIDA	84
a.	Cromatografia per vitamine liposolubili e carotenoidi	84
b.	Cromatografia per i retinil esteri	87
2.1.6	SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM (MS/MS)	89
a.	vitamine liposolubili e carotenoidi	90
b.	Retinoidi	92

2.1.7	RIVELAZIONE UV-VISIBILE A SERIE DI DIODI (DAD)	94
2.2	SVILUPPO DEL METODO PER VITAMINE LIPOSOLUBILI E CAROTENOIDI	94
2.2.1	STUDIO DELLA FRAMMENTAZIONE ED OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI IMPIEGATE IN MS/MS	94
a.	Vitamina A: retinolo	94
b.	Vitamina E: α -, γ -, e δ -tocoferolo	96
c.	Vitamina D: ergocalciferolo (D2) e colecalciferolo (D3)	97
d.	Vitameri K: fillochinone (K1) e menachinone-4 (K2)	98
e.	Caroten: β -carotene	100
f.	Xantofille: luteina, zeaxantina e β -criptoxantina	101
2.2.2	IDENTIFICAZIONE DEI CAROTENOIDI MEDIANTE DIODE ARRAY DETECTOR (DAD)	104
2.2.3	OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI DI LAVORO DELLA SORGENTE APCI (ATMOSPHERIC PRESSURE CHEMICAL IONIZATION)	108
2.2.4	OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE E SELETTIVITÀ DEL METODO	110
2.2.5	OTTIMIZZAZIONE DELLA PROCEDURA ESTRATTIVA	113
2.3	SVILUPPO DEL METODO PER I RETINIL ESTERI	116
2.3.1	STUDIO DELLA FRAMMENTAZIONE ED OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI IMPIEGATE IN MS/MS	116
2.3.2	OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI DI LAVORO DELLA SORGENTE APCI	121
2.3.3	OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE	122
2.3.4	OTTIMIZZAZIONE DELLA PROCEDURA ESTRATTIVA	126
2.4	RISULTATI E DISCUSSIONE	130
2.4.1	STABILITÀ DEGLI ANALITI NELLA MISCELA DI LAVORO	130
a.	vitamine liposolubili e carotenoidi	130
b.	retinil esteri	131
2.4.2	VALIDAZIONE DEL METODO E ANALISI QUANTITATIVA	131
a.	Standard interno	132
b.	Metodo delle aggiunte standard: range dinamico lineare e sensibilità	133
c.	Recuperi e Precisione del metodo	141

d.	Limiti di rilevabilità e di quantificazione	143
2.4.3	SCREENING DI CAROTENOIDI MEDIANTE L'ACCOPPIAMENTO HPLC-DAD-QqQ	146
2.4.4	CARATTERIZZAZIONE DEL LATTE CRUDO PER LE DIVERSE SPECIE ANIMALI	149
a.	Risultati dell'analisi quantitativa per vitamine liposolubili e carotenoidi	149
b.	Risultati dell'analisi quantitativa per i retinoidi	153
3.	CONCLUSIONI	159
4.	BIBLIOGRAFIA	162

1. INTRODUZIONE

Il latte è un alimento completo che contiene tutti i nutrienti necessari a sostenere la vita. È il primo alimento con cui si nutrono i mammiferi alla nascita e questa sua funzione ha trovato espressione simbolica in diversi racconti mitologici e religiosi nel corso del tempo.

Oggi il termine “latte” è sinonimo di latte vaccino, ma i vari popoli della terra hanno addomesticato ed allevato le specie della fauna locale per assicurarsene costantemente la disponibilità:

- Renna in Lapponia
- Bufala in India, Pakistan e Malesia
- Zebù in Madagascar
- Cammella in Medio Oriente
- Mucca, capra, pecora e asina in quasi tutto il mondo.

Gli studi pubblicati nella letteratura scientifica sono rivolti soprattutto alla caratterizzazione dei macronutrienti del latte vaccino, mentre il suo profilo vitaminico e carotenoidico risulta ancora incompleto e non rappresentativo delle molteplici forme, incluse in ciascun gruppo, caratterizzate da un diverso grado di attività biologica. Quasi completamente assenti sono, invece, le informazioni sulla composizione dei micronutrienti idro e liposolubili del latte prodotto dalle altre specie animali. Una limitazione fondamentale ad un rapido ampliamento delle conoscenze è strettamente connessa con l'inadeguatezza delle tecniche e delle procedure analitiche tuttora applicate per la loro analisi, particolarmente complicata da una serie di fattori riguardanti la loro eterogeneità chimica, la labilità, l'eventuale legame con gli altri costituenti di un alimento (per esempio grassi, polisaccaridi e proteine), le basse concentrazioni endogene e la complessità delle matrici alimentari.

Questa serie di difficoltà intralcia sia la definizione di condizioni sperimentali adatte ad una determinazione simultanea delle vitamine idrosolubili e/o liposolubili che l'analisi diretta dei diversi omologhi appartenenti ad uno stesso gruppo (vitameri). Per tali motivi, ancora oggi si preferisce analizzare ciascuna vitamina singolarmente [1], liberando le forme legate mediante idrolisi chimica o enzimatica e convertendo, quando possibile, tutti i vitameri in una singola forma stabile, espressione del contenuto vitaminico totale [1], ma non necessariamente della forma più abbondante di quella vitamina né di quella realmente presente nell'alimento. Un siffatto modo di procedere preclude, dunque, la definizione di un puntuale ed effettivo profilo vitaminico,

qualificante l'alimento in esame, e complica l'attribuzione delle proprietà da esso manifestate attraverso la sua assunzione.

La letteratura scientifica descrive diversi metodi per la determinazione multivitaminica mediante tecniche cromatografiche, ma la maggior parte sono rivolti all'analisi di alimenti fortificati e quindi di forme sintetiche. Ad oggi, sono fondamentalmente due i metodi basati sulla liquido-massa in grado di caratterizzare numerose forme endogene presenti nelle matrici esaminate [2, 3].

In questo lavoro di tesi di dottorato, il primo obiettivo è stato quello di caratterizzare la frazione vitaminica liposolubile e carotenoidea del latte prodotto da diverse specie di erbivori (mucca, bufala, pecora, capra ed asina). Tale caratterizzazione è stata realizzata attraverso la determinazione diretta della vitamina A (retinolo), D (colecalfiferolo o vitamina D₃, ergocalciferolo o vitamina D₂), E (α -, δ -, γ -tocoferolo), K (fillochinone o vitamina K₁, menachinone-4 o vitamina K₂) e di alcuni carotenoidi (β -carotene, luteina, zeaxantina, β -criptoxantina), ottimizzando la saponificazione a freddo come procedura estrattiva simultanea. Per lo screening di altri carotenoidi i cui standard sono commercialmente indisponibili o costosi, si usava un approccio "omico" basato sulla cromatografia liquida accoppiata in serie al rivelatore diode array e ad uno spettrometro di massa tandem (HPLC-DAD-MS/MS).

La saponificazione a freddo, ottimizzata come procedura per l'estrazione simultanea di vitamine e carotenoidi, ha fornito il contenuto di vitamina A totale, quantificando il retinolo. Una parte di questo lavoro è stata, quindi, rivolta a definire la dettagliata composizione dei vitameri A nel latte di piccoli e grandi ruminanti.

I composti con attività vitaminica A sono presenti nel latte principalmente come retinoidi (retinolo e retinil esteri) ed in misura minore come carotenoidi (provitamine A). Le forme più abbondanti sono esteri del retinolo con acidi grassi saturi ed insaturi, mentre solo una piccola frazione è costituita da retinolo libero.

I retinoidi sono necessari per la visione, la crescita e la differenziazione cellulare, per la riproduzione ed il mantenimento del sistema immunitario. Nonostante studi mirati abbiano chiarito il meccanismo di assorbimento e di trasporto attivo del retinolo, ci sono importanti questioni che rimangono irrisolte e che riguardano la sua distribuzione negli alimenti, il suo rilascio, il turnover e la tossicità.

È stato verificato che la biodisponibilità, ovvero la frazione di vitamina che l'organismo è in grado di assorbire, della vitamina A preformata (retinoidi) è molto più grande di quella dei carotenoidi

precursori. Queste forme sono entrambe presenti nel latte, ma molto poco è noto circa il profilo quali-quantitativo dei retinil esteri nel latte bovino e in quello di altre specie animali. Il motivo principale è dovuto ad una serie di problemi analitici quali la difficoltà di approvvigionamento degli standards, il loro costo e la complessità della messa a punto della separazione cromatografica. Molti lavori presenti in letteratura [4, 5, 6, 7] suggeriscono l'espedito della saponificazione semplificando l'analisi della vitamina A, dal momento che tutti gli esteri sono convertiti in retinolo, unica forma ad essere quantificata.

Una sola pubblicazione del 1989 [8] descrive lo studio, realizzato mediante HPLC-UV ($\lambda = 325\text{ nm}$), del profilo dei retinoidi nel latte vaccino, caprino e umano. Nonostante l'uso di un sistema tandem di colonne cromatografiche C_{18} , l'autore riportava la coeluzione delle due coppie retinil-laurato/arachidonato e retinil-miristato/palmitoleato; inoltre, la complessità della matrice analizzata e la scarsa selettività del sistema di rivelazione utilizzato portavano ad un'identificazione delle varie forme basata esclusivamente sul loro tempo di ritenzione cromatografico.

Il secondo obiettivo di questa tesi di dottorato è stato quindi definire la distribuzione di quattordici vitameri A (retinolo, retinil caprilato, retinil caprato, retinil palmitoleato, retinil laurato, retinil miristato, retinil pentadecanoato, retinil palmitato, retinil eptadecanoato, retinil linoleato, retinil oleato, retinil stearato, retinil linolenato, retinil eicosanoato) nel latte crudo vaccino, ovino, caprino e bufalino attraverso lo sviluppo di un metodo analitico affidabile, basato su un sistema tandem di colonne cromatografiche a fase inversa (C_{18}/C_{18} e C_{18}/C_{30}) accoppiate ad uno spettrometro di massa tandem, e su una procedura di estrazione diretta con solvente.

1.2 IL LATTE

Il latte è una matrice biologica estremamente complessa che si presenta come un fluido di colore bianco o giallo chiaro, contenente molti nutrienti (principalmente grassi, proteine, zuccheri e sali minerali), e con le caratteristiche di tre fasi chimiche: una emulsione diluita di sostanze grasse, una dispersione colloidale di proteine, una soluzione di sostanze idrosolubili [9].

La composizione chimica del latte varia più o meno sensibilmente tra le diverse specie animali e, nell'ambito della stessa specie, soprattutto in funzione della razza e del tipo di alimentazione. Una composizione indicativa del latte vaccino, bufalino, caprino, ovino e asinino è riportata in tabella 1:

Tabella 1: principali costituenti di latte prodotto da diverse specie animali destinato al consumo umano [10]

Costituente	Acqua	Grasso	Proteine	Lattosio ^a	Ceneri
	(% , w/w)				
<i>Bovino</i>	86.6	4.6	3.4	4.9	0.5
<i>Bufalino</i>	84.2	6.6	3.2	5.2	0.8
<i>Caprino</i>	86.5	4.5	3.5	4.7	0.8
<i>Ovino</i>	79.4	8.6	6.7	4.3	1.0
<i>Asinino</i>	90.0	1.3	1.7	6.5	0.5

^a altri carboidrati sono presenti a livello di tracce.

In particolare, i più elevati livelli di grasso e caseina del latte ovino e bufalino si riflettono sulle loro proprietà di coagulazione: infatti, essi tendono a coagulare più rapidamente di quello di bovino e caprino.

Il latte di mucca, con 551 bilioni di litri prodotti ogni anno (~84% della produzione mondiale), è il latte più prodotto al mondo per facilità di allevamento della specie bovina e conseguente abbattimento dei costi. Il latte di bufala lo segue con 82 bilioni di litri annui (12.5%) [11], dei quali il 60 % è prodotto dall'India e il restante 31% dal Pakistan.

1.2.1 COMPOSIZIONE CHIMICA

a. Proteine

Le proteine del latte vengono divise in due classi:

- le caseine, che costituiscono l'80% della frazione proteica e che risultano insolubili in mezzi debolmente acidi;
- le proteine del siero, che rappresentano il restante 20% e si mantengono solubili dopo acidificazione.

Le **caseine** sono una famiglia di proteine, suddivisibili nelle quattro frazioni α , β , κ e γ ; le prime tre sono prodotte direttamente nella ghiandola mammaria, mentre la γ -caseina proviene dai segmenti C-terminali della β -caseina, scissi per azione delle proteasi naturalmente presenti nel latte. Le quattro frazioni differiscono nella struttura primaria, principalmente a livello dei residui amminoacidici carichi, idrofobici e serine fosforilate; ciascuna frazione contiene poi delle varianti

genetiche, indicate come A, B, C, D ed E. Soltanto il 10% delle caseine totali è presente come monomeri solubili nel siero (caseine del siero), mentre la porzione principale è aggregata in complessi e micelle, come illustrato in figura 1.

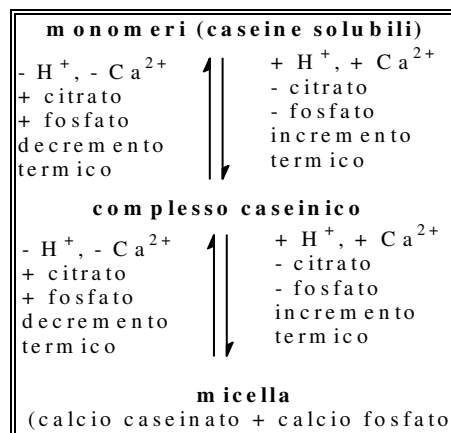


Figura 1: formazione dei complessi e delle micelle caseiniche.

I monomeri sono tenuti insieme mediante *i*) interazioni idrofobiche minime a temperature inferiori ai 5 °C, *ii*) interazioni elettrostatiche, come ponti calcio o fosfato di calcio tra residui di fosfoserina e di acido glutammico (figura 2), *iii*) legami idrogeno.

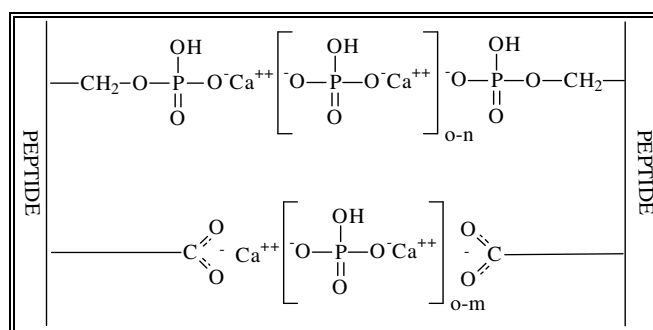


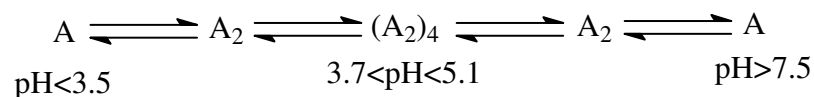
Figura 2: catene peptidiche legate tramite ponti calcio fosfato per formare le micelle caseiniche, complessi macromolecolari che inglobano sali minerali come i fosfati di calcio e magnesio e i citrati (*n* e *m* = numeri di ponti calcio fosfato).

Ciascuna micella è formata da diverse subunità (*M* ~ 760000 *Da*), che consistono di circa trenta differenti caseine monomeriche. Esistono due tipi di subunità: una contenente κ-caseine ed una che non le contiene. La κ-caseina si distingue dalle altre caseine in quanto, essendo glicosilata, non dà

aggregati con gli ioni Ca^{2+} , impedendo alle micelle di associarsi e precipitare. Infatti, le molecole di κ -caseina sono sistemate sulla superficie delle submicelle corrispondenti e le loro estremità idrofiliche C-terminali protrudono come capelli dalla superficie, prevenendo l'aggregazione per motivi sterici.

Le caseine, proprio per la loro organizzazione micellare, sono facilmente isolabili dal latte per centrifugazione e precipitano per acidificazione, in quanto contengono un numero elevato di amminoacidi dicarbossilici. La precipitazione acida a pH 4.6 è una procedura analitica applicata per separare le caseine (punto isoelettrico a pH = 4.6) dalle proteine del siero.

Le **sieroproteine** sono quelle proteine globulari che non sedimentano per centrifugazione e precipitazione acida o presamica. Sono disperse molto finemente all'interno della matrice e sono più stabili delle micelle di caseina; sono soggette a denaturazione in seguito a riscaldamento. Le proteine più importanti di questa classe sono la β -lattoglobulina e la α -lattoalbumina: la prima rappresenta quasi la metà delle proteine del siero nel latte bovino, la seconda è presente in percentuali minori, è dotata di potere batteriostatico e la sua presenza nelle cellule della ghiandola mammaria è necessaria per la sintesi del lattosio, costituendo la subunità B dell'enzima lattosio sintetasi. La β -lattoglobulina esibisce una oligomerizzazione pH-dipendente:



Quindi, il monomero è stabile solo a pH minore di 3.5 o maggiore di 7.5

Una denaturazione irreversibile avviene per valori di pH maggiori di 8.6, oppure per riscaldamento o per concentrazioni più elevate di ioni Ca^{2+} .

Il siero contiene molte **altre proteine** tra cui le immunoglobuline, che conferiscono proprietà immunologiche al latte, le lattoferrine, glicoproteine fosforilate deputate al trasporto del ferro, le sieralbumine ed enzimi. Il latte contiene un gran numero di enzimi, importanti dal punto di vista analitico per rivelare tipo ed estensione del trattamento termico. Il gruppo più significativo è costituito dalle idrolasi, che include lipasi, amilasi, esterasi, proteinasi, e fosfatasi. Importanti ossidoriduttasi sono l'aldeide deidrogenasi (o xantina ossidasi), la lattoperossidasi e la catalasi.

Le sieroproteine del latte sono molecole biologicamente attive, in quanto sono presenti nella loro struttura primaria brevi sequenze amminoacidiche, liberate dopo digestione enzimatica, che presentano attività locale e sistemica su vari organi e apparati. I più importanti effetti svolti a livello locale riguardano la digestione degli alimenti come ad esempio la stimolazione della secrezione di insulina, l'aumento dell'assorbimento del calcio e di altri micronutrienti. Le attività sistemiche vedono funzionare questi peptidi bioattivi come veri e propri ormoni regolatori (attività antitrombotica).

b. Lipidi

Il contenuto lipidico del latte vaccino è molto importante in quanto ne attesta il valore nutrizionale e commerciale ed è circa del 3,5%. La composizione percentuale della parte grassa del latte è presentata in tabella 2:

Tabella 2: *lipidi del latte.*

Frazione lipidica	%, w/w
Triacilgliceroli	93-96
Diacilgliceroli	1.3-1.6
Monoacilgliceroli	0.02-0.04
Gliceridi chetoacidi	0.9-1.3
Gliceridi idrossiacidi	0.6-0.8
Acidi grassi liberi	0.1-0.4
Fosfolipidi	0.8-1.0
Sfingolipidi	0.06
Steroli	0.2-0.4

Data l'elevata quantità di acqua, la frazione grassa è presente nella matrice in emulsione sotto forma di globuli di grasso (diametro medio 0.1-15 μm) (figura 3). Queste goccioline rappresentano un complesso sistema biologico in quanto sono costituite all'interno da un doppio strato di trigliceridi, esternamente ricoperto da una sottilissima membrana lipoproteica, spessa circa 8-9 nm e formata da fosfolipidi e da un doppio strato di proteine. Questa proviene dalla membrana della cellula mammaria che secerne i globuli, ricoprendo appunto il doppio strato di trigliceridi mentre passano

dal citoplasma cellulare al lume dell'alveolo. La composizione chimica della membrana è riportata in tabella 3.

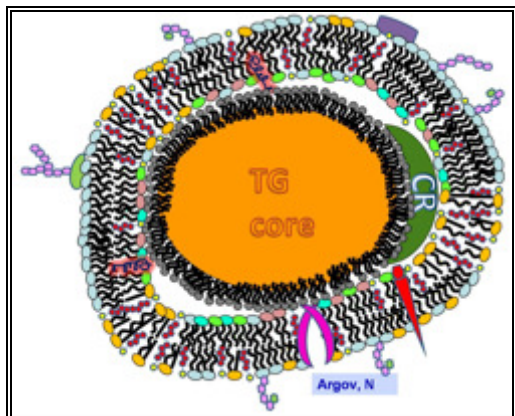


Figura 3: struttura di un globulo di grasso.

Tabella 3: composizione della membrana dei globuli di grasso del latte.

Costituente	%, w/w
Proteine	41
Fosfo- e glicolipidi	30
Colesterolo	2
Gliceridi	14
Acqua	13

In aggiunta alle lipoproteine, la membrana contiene anche enzimi, tra cui la lipasi lipoproteica. La membrana svolge una funzione protettiva dei globuli dall'attacco enzimatico, impedendo la lipolisi, e di stabilizzazione del sistema in sospensione, in quanto impedisce la flocculazione e l'aggregazione dei globuli. In effetti, se la mungitura e la conservazione sono condotte in modo appropriato, il latte crudo può mantenersi per diversi giorni senza sviluppare un gusto rancido. La distruzione della struttura organizzata della membrana, per esempio mediante omogeneizzazione, permette alla lipasi di legarsi ai globuli di grasso e di idrolizzare i triacilgliceroli ad alta velocità. Il latte assume un gusto sgradevole entro pochi minuti. Per tale motivo, la lipasi lipoproteica deve essere inattivata dalla pastorizzazione prima del processo di omogeneizzazione del latte.

Nel latte sono presenti molti diversi acidi grassi e la tabella 4 mostra un confronto tra gli acidi grassi a catena lineare nel grasso di latte di capra, di mucca e di pecora. Per i diversi tipi di latte i principali acidi grassi sono acido palmitico (C16:0), acido oleico (C18:1, *cis*- Δ^9 o c9), acido miristico (C14:0) e acido stearico (C18:0); il latte di asina si discosta da questi valori avendo concentrazioni più elevate di acido caprico/caprinico (C10:0) e acido caprilico (C8:0).

Tabella 4: *composizione in acidi grassi del latte caprino, vaccino, ovino e asinino*
(%, $w_{\text{acido grasso}}/w_{\text{grasso totale latte}}$).

Acido grasso	mucca	bufala	capra	pecora	asina
<i>Butirrico (C4:0)</i>	2,5	2,8	2,6	4,0	0,6
<i>Caproico (C6:0)</i>	2,1	1,9	2,9	2,6	1,2
<i>Caprilico (C8:0)</i>	1,4	1,1	2,7	2,5	12,8
<i>Caprico/caprinico (C10:0)</i>	2,5	1,8	8,4	7,5	18,6
<i>Laurico (C12:0)</i>	2,9	2,3	3,3	3,7	10,6
<i>Miristico (C14:0)</i>	11,1	11,8	10,3	11,9	5,7
<i>Palmitico (C16:0)</i>	34,0	36,0	24,6	25,2	11,4
<i>Palmitoleico (C16:1)</i>	1,6	1,9	2,2	2,2	2,37
<i>Stearico (C18:0)</i>	11,0	9,9	12,5	12,6	1,2
<i>Oleico (C18:1)</i>	22,1	20,3	28,5	20,0	9,65
<i>Linoleico (C18:2)</i>	2,5	2,4	2,2	2,1	8,15

Sebbene la frazione lipidica del latte vaccino e bufalino sia composta per circa il 70% da acidi grassi saturi, il latte di bufala, rispetto a quello di mucca, contiene minori quantità di acido oleico (C18:1 c9) e maggiori quantità di acidi grassi *trans* C18:1, principalmente acido vaccenico (C18:1 tr11) e rumenico (C18.2 c9 tr11), il principale acido linoleico coniugato (CLA). I lipidi del latte ovino sono piuttosto simili a quelli del latte caprino; quest'ultimo, tuttavia, ha proporzioni più elevate di acidi grassi a catena corta, in particolare quello caprinico che gli conferisce un sapore particolarmente forte.

Il latte di capra è un latte più digeribile rispetto a quello bovino, sia relativamente ai componenti proteici che lipidici [12]. I globuli di grasso sono più piccoli (naturale omogeneizzazione) e hanno un'area superficiale più grande (maggiore percentuale di acidi grassi a catena corta). Ciò fa sì che nell'intestino le lipasi riescano ad attaccare i lipidi più rapidamente; ci vuole infatti circa il 20% di tempo in meno per digerire il latte caprino.

c. Glucidi

Lo zucchero presente in maggiore quantità nel latte è il lattosio (4-6%), un disaccaride formato da glucosio e galattosio che può esistere nelle forme α e β a seconda della posizione assiale o equatoriale dell'ossidril sul carbonio anomero. Il lattosio viene sintetizzato nelle cellule

mammarie e svolge due funzioni importanti: *i*) facilita l'assorbimento del calcio; *ii*) è il substrato della fermentazione lattica nella produzione di derivati del latte.

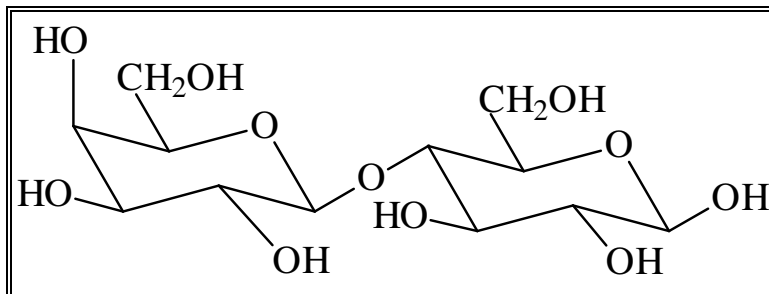


Figura 4: β -lattosio (*O*- β -D-galattopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranosio).

Il latte contiene inoltre altri carboidrati in tracce come glucosio, galattosio, N-acetilglucosammina, zuccheri fosforilati e oligosaccaridi.

Paragonato al latte vaccino, quello di bufala è più ricco non solo in grassi, ma anche in lattosio, proteine (specialmente caseine) e minerali come calcio, magnesio e fosfato inorganico [13].

d. Sali minerali

Sono ioni metallici, anioni inorganici e organici che rappresentano circa l'1% (w/w) del latte. Provengono dal plasma sanguigno, ma nel latte si trovano in concentrazioni diverse rispetto a quest'ultimo in quanto la ghiandola mammaria svolge un ruolo selettivo dei minerali per conferire al latte la miscela salina in proporzioni utili alla crescita.

La composizione in termini di minerali più abbondanti è riportata in tabella 5 per il latte caprino, ovino e vaccino.

Tabella 5: *composizione in minerali del latte caprino, vaccino e ovino [14].*

Componente	capra	pecora	mucca
Ca (% w/w)	0.194	0.160	0.184
P (% w/w)	0.270	0.145	0.235
Cl (% w/w)	0.154	0.270	0.105

e. Vitamine e carotenoidi

Benché il latte vaccino crudo contenga tutte le vitamine, tra le liposolubili hanno importanza significativa la vitamina A, la vitamina E, e i carotenoidi, presenti nel periodo estate-autunno, mentre tra le idrosolubili la B₁, la B₂, la B₁₂ e l'acido pantotenico [9].

Tabella 6: contenuto di vitamine idrosolubili, liposolubili e carotenoidi nel latte vaccino [9].

Vitamine idrosolubili	mg/L	Vitamine liposolubili e carotenoidi	mg/L
B1 (tiamina)	0.4	A (retinolo)	0.4
B2 (riboflavina)	1.7	D (calciferolo)	0.001
B3 (nicotinammide)	1	E (tocoferoli totali)	1
B5 (acido pantotenico)	3.5	K	0.04 [15]
B6 (piridossina)	0.6	β-carotene	0.2 [16]
B9 (acido folico)	0.05		
B8 (biotina)	0.03		
B12 (cianocobalammina)	0.005		
C (acido ascorbico)	20		

Oltre al *all-trans*-β-carotene, altri carotenoidi rivelati nel latte vaccino sono la luteina, la zeaxantina e tracce di β-criptoxantina. La loro presenza dipende dal tipo e dalla qualità del foraggio che, se essiccato, potrebbe risultarne carente o totalmente privo [15, 16, 17, 18].

e. Altri costituenti

Il latte contiene acidi organici sintetizzati dalla ghiandola mammaria come ad esempio l'acido citrico (1.8 g/L), che con i citrati è responsabile del potere tampone del latte. Durante la conservazione l'acido citrico scompare rapidamente come risultato dell'azione dei batteri. Altri acidi (acetico, lattico) sono prodotti di degradazione del lattosio. La presenza di acido orotico (73 mg/L), intermedio nella sintesi dei nucleotidi pirimidinici, è specifica per il latte. Infatti, l'acido orotico, così come la creatina e l'acido urico, sono indicatori per la determinazione della proporzione di latte negli alimenti.

Il latte contiene inoltre ormoni (tiroidei, ipofisari e surrenalici) e cellule provenienti dal sangue e dal tessuto mammario. Inoltre, il latte contiene particelle lipoproteiche, note anche come *microsomi* del

latte, che consistono fondamentalmente in residui di membrane cellulari, microvilli e cellule somatiche, rappresentate soprattutto dai leucociti.

La presenza di microrganismi provenienti dalle mammelle dell'animale, in prevalenza batteri (lattici, proponici, enterobatteri, clostridi, batteri proteolitici, lipolitici, lieviti e muffe), richiede che anche un latte, raccolto da animali sani in condizioni asettiche, necessiti di processi di risanamento per renderlo sicuro dal punto di vista igienico-sanitario.

1.2.2 TIPI DI LATTE

Il latte prodotto da animali da allevamento deve rispettare numerosi requisiti igienico-sanitari secondo la normativa vigente (DPR 54/97). Può essere destinato al consumo diretto o alle industrie di trasformazione; in particolare, quello destinato al consumo diretto viene diviso in due categorie:

- **Latte naturale** in cui rientrano latte crudo, fresco intero pastorizzato, UHT (Ultra High Temperature), sterilizzato, o più in generale quei tipi di latte che hanno subito solo trattamenti necessari a garantire la salubrità e la conservabilità per tempi più o meno lunghi;
- **Latte modificato o speciale**, sottoposto a processi tali da conferirgli nuove caratteristiche chimico-fisiche, nutrizionali, organolettiche; questa categoria comprende latte scremato, concentrato, in polvere, aromatizzato, dietetico (delattosato, vitaminizzato), e fermentato (yogurt).

Per **latte crudo** si intende “il prodotto ottenuto mediante secrezione della ghiandola mammaria di vacche, pecore, capre, bufale o asine non sottoposto ad una temperatura $> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ né ad un trattamento con effetto equivalente” (DPR 54/97). Può essere venduto per il consumo umano diretto, ma deve provenire da animali riconosciuti idonei in seguito a visita sanitaria, essere raccolto e commercializzato in condizioni igieniche ineccepibili, e rispondere ai parametri di qualità fissati dalla normativa.

Nel caso in cui il latte crudo sia destinato alla produzione di latte pastorizzato, UHT o sterilizzato, può essere sottoposto a trattamento termico iniziale.

Il latte crudo non trattato termicamente presenta una flora batterica in condizioni controllate benefica, ma potrebbe essere soggetto a inquinamenti in assenza del rispetto delle norme igieniche da parte del produttore. Enzimi, lisozima e proteine attive non sono denaturati, in quanto il latte non ha subito trattamenti, e molti sali inorganici, ad esempio di calcio e di fosforo, sono in forma

maggiormente solubile ed assimilabile dall'organismo. Anche la caseina risulta più digeribile, al contrario della frazione lipidica, meno emulsionata. Le vitamine termolabili sono presenti in toto, anche qui per l'assenza di trattamenti termici; il latte è infatti solamente filtrato e munto in giornata ma consumato entro due giorni, se non bollito. La quantità acquistabile non è vincolata dalla confezione; inoltre viene distribuito ad un prezzo al consumo mediamente più basso (0.8-1.0 €/L, Dicembre 2008, Italia).

1.2.3 CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Il colore del latte è influenzato dall'assorbimento e dalla diffusione della luce da parte dei globuli di grasso e delle micelle proteiche dispersi in esso. Per tale motivo, il latte scremato appare bianco. Un colore giallastro, cioè giallo-verde, deriva dal carotene (ingerito principalmente durante il pascolo), presente nella fase grassa, e dalla riboflavina, presente nella fase acquosa. Il latte ha un sapore leggermente dolce, mentre il suo odore è indistinto.

Il principale componente del latte è l'acqua, in cui gli altri costituenti sono distribuiti in diverse entità colloidali¹: globuli di grasso, micelle caseiniche, aggregati delle proteine del siero. Carboidrati e minerali sono in soluzione, solubilizzati nel siero del latte.

Le proprietà dei principali elementi strutturali del latte sono riportate in tabella 7.

¹ I colloidi sono dispersioni di minuscole particelle (500 nm di diametro) di un materiale in un altro. In genere si tratta di aggregati di numerosi atomi o molecole, ancora troppo piccoli per risultare visibili al microscopio ottico. Essi attraversano la maggior parte delle carte da filtro, ma si possono rilevare grazie alla diffusione della luce, alla sedimentazione, all'osmosi.

La denominazione dei colloidi dipende dal carattere delle due fasi presenti. I *sol* sono dispersioni di solidi in liquidi (per esempio agglomerati di atomi di oro in acqua) o di solidi in solidi (come il vetro rubino che è un sol di oro nel vetro e manifesta il caratteristico colore in virtù della diffusione). Gli *aerosol* sono dispersioni di liquidi in gas (nebbia, nebulizzazioni e i cosiddetti spray) e di solidi in gas (fumo). Le *emulsioni* sono dispersioni di liquidi in liquidi (latte). Qualche volta si includono anche le *schiume*, dispersioni di gas in liquidi (birra), o di gas in solidi (pomice).

Un'ulteriore possibile classificazione distingue i colloidi in *liofili* (inclinati ad attrarre il solvente) e *liofobi* (inclinati a respingerlo) oppure, se si tratta dell'acqua, in *idrofilo* e *idrofobo*.

La caratteristica principale dei colloidi è la grandissima area di superficie della fase dispersa ma, proprio in conseguenza di ciò, i colloidi risultano termodinamicamente instabili rispetto al materiale in massa. La stabilità cinetica delle particelle colloidali è data dall'esistenza di una carica elettrica alla loro superficie. Grazie a tale carica, gli ioni di segno opposto tendono a riunirsi nello spazio circostante e a formare un'atmosfera ionica. Occorre distinguere due regioni di carica: l'insieme dello strato carico interno e dell'atmosfera ionica esterna prende il nome di *doppio strato elettrico*. La struttura dell'atmosfera ionica si presta ad essere descritta con la teoria di Debye e Hückel nel caso delle soluzioni ioniche. La lunghezza di Debye diminuisce all'aumentare della forza ionica del mezzo e a forza ionica elevata l'atmosfera è densa e il potenziale cade al valore della massa a breve distanza. In queste circostanze, la repulsione atta ad ostacolare l'avvicinarsi di due particelle colloidali si attenua e il risultato è la rapida *coagulazione* (o *flocculazione*) causata dalle forze di Van der Waals. Dato che la forza ionica aumenta per l'aggiunta di ioni, particolarmente di quelli a carica elevata, questi si comportano da agenti flocculanti (*regola di Schultze-Hardy*).

Tabella 7: i principali elementi strutturali del latte [9].

elementi	tipo di dispersione	numero (L^{-1})	diametro (mm)	superficie (m^2/L)	densità specifica (g/mL)
<i>globuli di grasso</i>	emulsione	10^{13}	100-10000	70	0.92
<i>micelle caseiniche</i>	sospensione	10^{17}	10-300	4000	1.11
<i>proteine del siero</i>	soluzione colloidale	10^{20}	3-6	5000	1.34
<i>particelle lipoproteiche</i>	sospensione colloidale	10^{17}	10	10	1.10

Le emulsioni sono in genere stabilizzate da un agente emulsificante che può essere un sapone, un detergente, o un sol liofilo che dia luogo ad un rivestimento protettivo intorno alla fase dispersa. L'agente emulsificante del latte, come emulsione di grassi in acqua, è la caseina. La parziale inefficienza della caseina come emulsificante è provata dalla separazione della panna alla superficie: i grassi della fase dispersa si riuniscono in goccioline oleose che galleggiano sulla superficie del mezzo acquoso. Il fenomeno si può prevenire rendendo la dispersione più fine, per esempio, per agitazione mediante ultrasuoni, cioè omogeneizzandolo.

La densità specifica del latte decresce all'aumentare del contenuto di grasso e aumenta con la quantità di proteine, zuccheri e sali. La densità specifica del latte vaccino varia tra 1.029 e 1.039 g/mL a 15 °C. Il latte scremato ha una densità specifica più elevata del latte intero.

Il punto di congelamento del latte può variare tra -0.53 e -0.55 °C. Questo valore è caratteristico ed è quindi utilizzato come test per la rilevazione di un eventuale annacquamento del latte.

Il pH del latte fresco è 6.50-6.75, mentre il grado di acidità, in accordo a Soxhlet-Henkel ($^{\circ}SH$)², è 6.5-7.5.

L'indice di rifrazione (n_D^{20}) è 1.3410-1.3480 e la conduttività specifica a 25 °C è $4-5.5 \times 10^{-3} \text{ ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Il potenziale redox è + 0.30 V per il latte crudo e + 0.10 V per il latte pastorizzato.

1.2.4 ANALISI

Il latte, essendo un prodotto alimentare, è sottoposto a tutela igienico-sanitaria e quindi ai relativi accertamenti da parte degli organi preposti.

² Il grado di acidità del latte espresso in gradi Soxhlet-Henkel ($^{\circ}SH$) equivale ai mL di NaOH 0.25 N utilizzati per neutralizzare 100 mL di latte.

Analisi chimiche vengono effettuate sul latte in entrata nelle Centrali del latte per attestarne la qualità secondo i requisiti previsti dalla normativa vigente, e anche sul latte in uscita diretto al consumo, per verificare l'efficacia delle operazioni di risanamento compiute.

Si effettuano analisi chimiche e batteriologiche con l'obiettivo di verificare se l'alimento possiede i requisiti igienici e qualitativi previsti dalla legge, appurare se esistono alterazioni, frodi, inquinamenti, valutare l'efficacia del trattamento termico subito dal latte.

Generalmente, l'alterazione più comune a cui va incontro il latte è l'inacidimento in seguito alla fermentazione lattica; le frodi consistono nell'aggiunta di acqua, scrematura, aggiunta di conservanti.

Il latte può essere inoltre contaminato da antibiotici e altri farmaci ad uso veterinario, pesticidi, metalli pesanti.

Secondo la normativa vigente (DPR 54/97), il latte di vacca, destinato al consumo, deve avere i seguenti titoli:

- peso specifico a $+ 10\text{ }^{\circ}\text{C} \geq 1.028\text{ g/mL}$
- proteine $\geq 2.8\%$ (28 g/L)
- residuo secco magro $\geq 8.5\%$
- indice crioscopico $\leq -0.520\text{ }^{\circ}\text{C}$ (sul latte crudo pastorizzato).

Dal punto di vista batteriologico nel latte pastorizzato i coliformi devono risultare praticamente assenti e la carica batterica totale, per ogni tipo di latte deve essere contenuta entro i seguenti limiti: pastorizzato $\leq 30000/\text{mL}$; UHT e sterilizzato $\leq 10/0.1\text{ mL}$.

Giornalmente, sul latte, possono essere effettuate analisi di routine, quali titolazione dell'acido lattico, determinazione di grasso, proteine, lattosio, residuo magro, determinazione di sodio e potassio, determinazione dell'indice di crioscopico, determinazione della carica batterica totale (ex potere riducente), ricerca della fosfatasi e della perossidasi, dosaggio delle sieroproteine solubili, conta batterica totale, ricerca dei coliformi, ricerca degli antibiotici, conta delle cellule somatiche. Altre analisi riguardano la determinazione delle ceneri, la determinazione del calcio e dei cloruri, la titolazione dell'ammoniaca, analisi gascromatografica della frazione lipidica, ricerca dei pesticidi.

1.3 LE VITAMINE

Le vitamine [9, 19, 20] sono composti organici, contenuti negli alimenti in quantità molto piccole (micronutrienti), indispensabili per l'accrescimento e il normale mantenimento degli organismi, la cui mancanza o insufficiente presenza nella dieta determina specifiche manifestazioni morbose, dette avitaminosi.

Le vitamine regolano il metabolismo tissutale ma non sono apportatrici di energia né entrano a far parte dei costituenti strutturali dell'organismo. Esse sono prodotte soprattutto nel regno vegetale, per lo più non vengono sintetizzate dagli organismi animali e pertanto devono essere assunte preformate negli alimenti con un fabbisogno giornaliero nell'ordine dei milligrammi o microgrammi (1000 volte più basso rispetto agli amminoacidi essenziali).

Sono composti organici con peso molecolare relativamente basso che presentano strutture chimiche molto varie per cui, al momento, l'unica classificazione valida è quella che le distingue in due gruppi in base alla solubilità: quello delle *vitamine liposolubili* (A, E, D, K) e quello delle *vitamine idrosolubili* (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₈, B₉, B₁₂, C). Complessivamente, dunque, le vitamine sono ripartite in 13 gruppi, ciascuno dei quali comprende un certo numero di sostanze a struttura simile, aventi gli stessi effetti biologici, note come vitameri.

Le vitamine idrosolubili svolgono principalmente la funzione di coenzimi e sono indispensabili a tutte le cellule viventi, vegetali o animali, dalla più semplice alla più complessa, mentre quelle liposolubili sono necessarie solo per i processi vitali degli animali superiori. Fa eccezione la vitamina K che, pur essendo classificata come liposolubile, si comporta alla stregua delle idrosolubili, rappresentando un fattore vitale indispensabile per qualsiasi sistema cellulare.

Non tutte le vitamine vengono assunte nella loro forma utilizzabile ma come precursori che vanno sotto il nome di *provitamine*. Una volta assunti, tali composti vengono trasformati nelle forme biologicamente attive utili all'organismo. Le vitamine seguono nell'assorbimento le stesse vie seguite dagli altri principi nutritivi; così le idrosolubili vengono assorbite nell'intestino tenue assieme ai glucidi e ai protidi, quelle liposolubili assieme ai lipidi. L'assunzione di vitamine deve essere costante nel tempo; attualmente, però, solo di alcune di esse sono note esattamente le quantità giornaliere raccomandabili (A, D, B₁, B₂, B₃, B₆, B₉, B₁₂).

1.3.1 LE VITAMINE LIPOSOLUBILI

È noto che le vitamine liposolubili si dividono in 4 gruppi (A, E, D, K), ciascuno dei quali comprende più forme con diversa potenza biologica. Le vitamine A, E, K sono sintetizzate a partire da un monomero a 5 atomi di carbonio, l'**isoprene**, che viene montato per formare catene di diversa lunghezza o anelli. La vitamina D invece deriva, nella sua forma animale, dal **colesterolo** e ha una struttura di base diversa dalle altre 3; la vitamina D è l'unica vitamina che l'uomo è in grado di sintetizzare.

Tutti questi micronutrienti sono coinvolti in importanti funzioni biologiche, come la visione (vitamina A), l'assorbimento del calcio (vitamina D), la protezione antiossidativa delle membrane cellulari (vitamina E e carotenoidi) e la coagulazione del sangue (vitamina K).

a. Vitamina D

La *vitamina D* include due composti con attività antirachitica prodotti per irradiazione solare: l'*ergocalciferolo* o *vitamina D2* in piante, funghi e lieviti; il *colecalfiferolo* o *vitamina D3* nel derma. Questi composti sono strutturalmente simili agli steroidi, hanno l'anello B aperto e differiscono l'uno dall'altro nella catena laterale (figura 5).

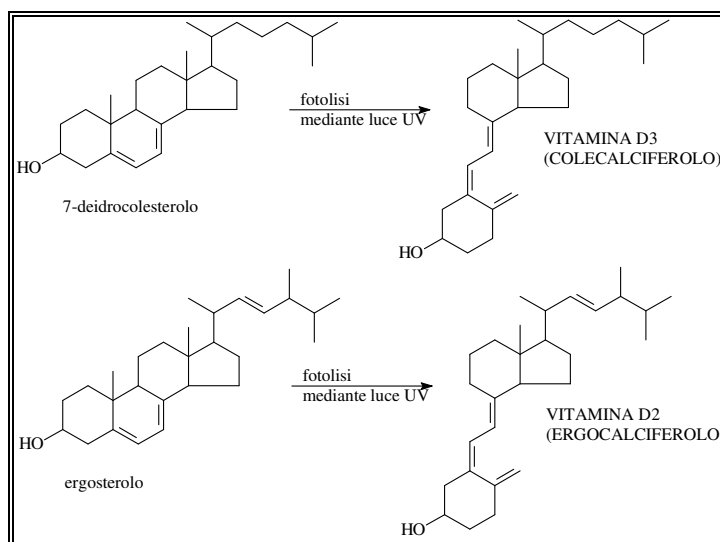


Figura 5: sintesi delle vitamine del gruppo D dalle corrispondenti provitamine per irradiazione.

La vitamina D contribuisce alla regolazione del metabolismo del calcio e del fosforo, ma per svolgere questa funzione richiede una prima idrossilazione, che avviene nel fegato e che la converte nel proormone *25-OH-D3* (*25-idrossicolecalciferolo* o *calcidiolo*), e una seconda nel rene che lo converte nell'ormone *1,25-[OH]₂-D3* (*1,25-diidrossicolecalciferolo* o *calcitriolo*). Il calcitriolo, forma attiva della vitamina, agisce come induttore di proteine coinvolte nella struttura della matrice ossea e nella calcificazione.

Nell'avitaminosi D si assiste ad una profonda alterazione del metabolismo minerale con ritardata o arrestata deposizione del fosfato tricalcico nel tessuto osseo in via di formazione ed un progressivo impoverimento in minerale di quella parte delle ossa già normalmente calcificate. Ciò porta ad una tipica manifestazione da carenza: il *rachitismo*, che si osserva soprattutto nei bambini nei primi anni di vita. Nell'adulto si manifesta invece un'altra sindrome da carenza: l'*osteomalacia* con alterazioni analoghe a quelle del rachitismo.

Il fabbisogno giornaliero di vitamina D è 10 µg di colecalciferolo (10 µg di colecalciferolo = 400 UI di vitamina D) dalla nascita fino a 18 anni; la stessa dose è necessaria alle persone anziane e alla donna per tutto il periodo della gravidanza e dell'allattamento. Per gli adulti la quantità consigliata è dai 5 ai 7.5 µg/die.

La vitamina D risulta sensibile all'ossigeno ed alla luce. La sua stabilità nel cibo non è un problema, poiché gli adulti realizzano di solito una riserva sufficiente di questa vitamina.

b. Vitamina E

La *vitamina E*, o *tocoferolo* o *vitamina antisterilità* ("tokos" in greco significa parto) esiste in natura sotto diverse forme aventi in comune un anello 6-cromanolico e una catena laterale isoprenoide satura a 16 atomi di carbonio in posizione 2; tali forme si differenziano tra loro per il numero e la posizione dei gruppi metilici sull'anello in α -, β -, γ -, δ -*tocoferolo* (figura 6). Tra questi, l' α -*tocoferolo* è quello che possiede la maggiore attività biologica ed è a questo che, comunemente, si attribuisce il nome di vitamina E. In realtà esiste anche un altro gruppo di composti naturali, biologicamente meno potenti dei tocoferoli, noti come *tocotrienoli* (α , β , γ , δ), in cui la catena isoprenoide è insatura.

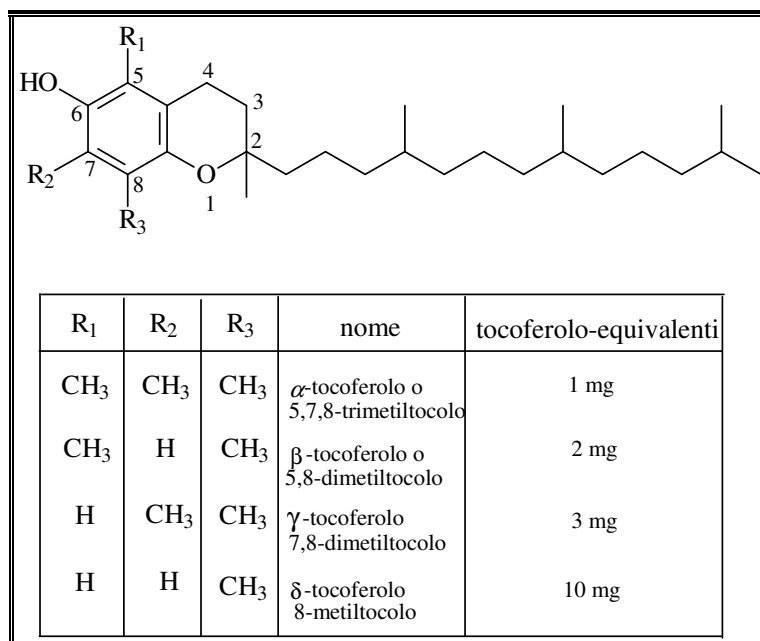


Figura 6: struttura dei tocoferoli: i tocoferoli presentano tre centri di chiralità (su C2, C4 e C8) ed i tocotrienoli uno solo (C2). L'α-tocoferolo ha una configurazione R su tutti e tre i centri di asimmetria e perciò viene detto anche RRR-tocoferolo.

L'attività della vitamina E è basata principalmente sulle sue proprietà antiossidanti che ritardano o prevengono l'ossidazione lipidica. Non sono ancora del tutto chiari le azioni ed i meccanismi con cui la vitamina E agisce: la perossidazione lipidica, scatenata dall'azione di radicali liberi, si sviluppa attraverso delle reazioni a catena e la vitamina E è in grado di bloccare questo fenomeno donando un elettrone ai radicali perossilipidici rendendoli in tal modo meno reattivi. Tale reazione redox trasforma la vitamina E in un *radicale α-tocoferossilico* che è piuttosto stabile (per risonanza) e che può reagire con la vitamina C o con il glutathione o con il coenzima Q10 (cioè con un altro antiossidante a potenziale ossidoriduttivo inferiore) per riformare l'α-tocoferolo.

I bisogni giornalieri di vitamina E sono stati valutati intorno a 4 mg per i neonati, 6 mg per i bambini fino a 4 anni di età, 10 mg nell'adolescenza e 15 mg per gli adulti.

Nell'uomo, le principali manifestazioni della carenza di vitamina E sono una lieve anemia emolitica dovuta a un'aumentata emolisi degli eritrociti e i disturbi spinocerebellari che si verificano principalmente nei bambini che hanno un malassorbimento dei grassi.

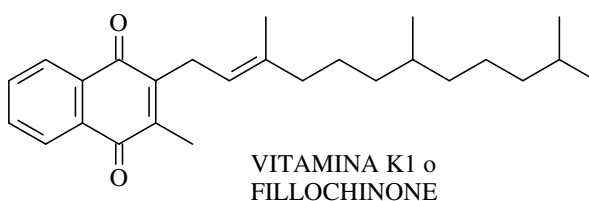
Le fonti principali sono rappresentate dagli oli vegetali (fino a ~ 27 mg/100 g di germe di grano), tuorlo dell'uovo (~ 6 mg), olio di fegato di merluzzo (~ 3.3 mg) e spinaci (~ 3 mg).

Per quanto concerne la stabilità, i tocoferoli sono facilmente degradati dall'ossigeno e dai raggi UV, mentre sono resistenti al calore.

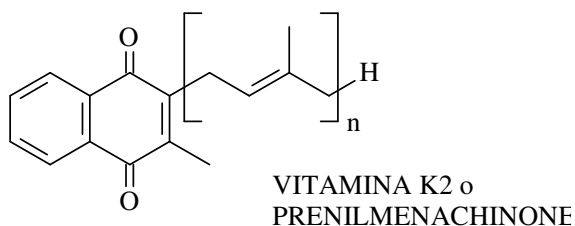
c. Vitamina K

La *vitamina K* o *Koagulation vitamin* è rappresentata da una famiglia di 2-metil-1,4-naftochinoni dotati di una diversa catena laterale in C3:

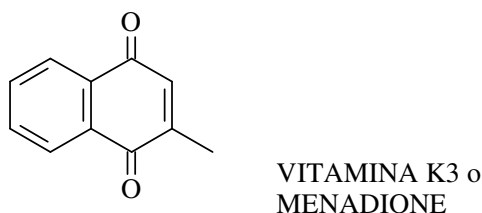
- il *fillochinone* o *vitamina K₁* ha una catena laterale fitilica, è di origine vegetale e costituisce la forma più presente nella dieta;



- La *vitamina K₂* o *prenilmenachinone* include un gruppo di composti di origine batterica che differiscono per il numero di unità isopreniche; sono anche chiamati *menachinoni-n* (con $n = 4 - 13$) e sono prodotti in quantità elevate dalla flora batterica intestinale;



- *vitamina K₃* o *menadione* è priva di catena laterale ed è una forma sintetica.



Nei mammiferi, la vitamina K è il cofattore della γ -glutamylcarbossilasi, enzima che catalizza la carbossilazione delle cosiddette proteine vitamina K-dipendenti (figura 7).

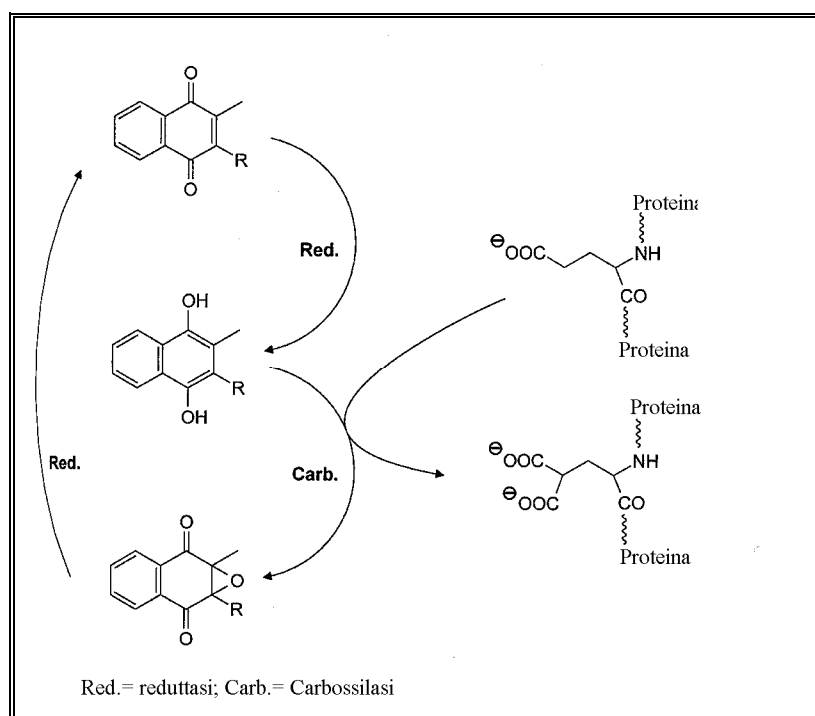


Figura 7: meccanismo di azione della vitamina K nella carbossilazione delle proteine vitamina K-dipendenti: la vitamina K sotto forma ridotta (idrochinonica) è il cofattore dell'enzima che catalizza la reazione di carbossilazione dell'acido glutammico per formare l'amminoacido γ -carbossigluttammico (Gla). Durante questo processo la forma idrochinonica (KH_2) è convertita in epossido da cui la vitamina K è rigenerata. Ciò fa sì che possano venir rese attive alcune proteine quali la protrombina ed i fattori VII, IX e X della coagulazione, le proteine C, M, S, Z plasmatiche, l'osteocalcina e la proteina Gla della matrice a livello dell'osso. Alcuni farmaci anticoagulanti (come la warfarina) svolgono la loro azione andando ad inibire le riduttasi, bloccando la formazione della forma KH_2 e determinando una diminuzione di alcuni fattori della coagulazione.

Vista la diffusione della vitamina K negli alimenti di origine vegetale e la produzione batterica, è difficile avere quadri carenziali. Negli adulti si può avere carenza di tale vitamina a seguito di trattamenti con antagonisti o a patologie recanti malassorbimento.

E' difficile valutare il quantitativo giornaliero raccomandabile di vitamina K, in quanto non ci sono dati sufficienti circa la sua distribuzione nei vari alimenti e non si è in grado di calcolare il contributo della sintesi batterica. Attualmente si suggerisce di assumerne $1 \mu g$ per Kg di peso corporeo.

I vitameri K sono degradati se esposti alla luce e agli alcali, mentre sono relativamente stabili verso l'ossigeno atmosferico e l'esposizione al calore.

1.3.2 VITAMINA A

I composti con attività vitaminica A [9, 19, 20, 21] sono rappresentati dai retinoidi (di origine animale) e dai loro precursori carotenoidi con attività provitaminica A (di origine vegetale). I retinoidi comprendono: retinolo (libero o sottoforma di estere con acidi grassi), retinaldeide e acido retinoico, insieme agli analoghi di sintesi.

Il *retinolo* o *axeroftolo* è un alcol primario insaturo costituito da una catena laterale polienica coniugata al C6 di un cicloesenile (anello β -ionone). Sedici sono i possibili isomeri geometrici ipotizzabili sulla base delle quattro insaturazioni presenti della catena isoprenoide (figura 8). Ad oggi, sono noti sei isomeri geometrici di cui il più attivo biologicamente è il *retinolo* “*tutto trans*” (100% di biopotenza), definito comunemente come *vitamina A* o *retinolo A1* o *vitamina A1*, seguito dal 13-*cis* (76%), 9-*cis* (19%) e 9,13-*di-cis* (16%). Si trova principalmente negli alimenti di origine animale prevalentemente esterificato con acido palmitico. Si conosce anche una *vitamina A2* (3,4-deidroretinolo) che si forma nei tessuti per deidrogenazione della vitamina A1 e con un'attività pari al 30 - 40% del retinolo; un'altra forma è il 3-idrossiretinolo o *vitamina A3* che si trova nell'olio di fegato di alcuni pesci. Esistono anche derivati aldeidici di ossidazione dei due retinoli: retinale 1 e 2 con circa il 90% di attività biologica. Il retinolo “*tutto trans*” per ossidazione del gruppo alcolico primario dà luogo al retinale e all'acido retinoico.

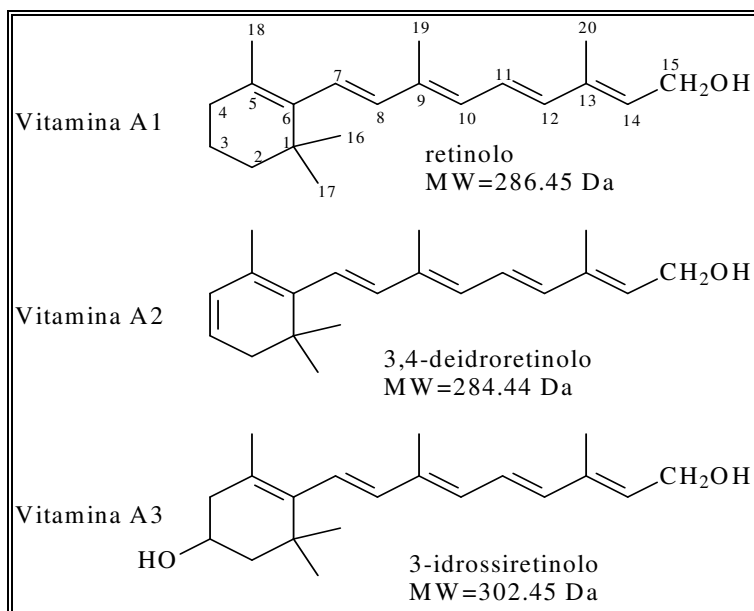


Figura 8: le tre forme della vitamina A; il doppio legame del cicloesenile è importante per la funzione vitaminica.

La vitamina A, in qualità di antiossidante, svolge una funzione protettiva e solo recentemente si è scoperto il suo ruolo antitumorale. È un essenziale fattore dietetico per la normale embriogenesi, per la crescita e differenziazione cellulare, per la riproduzione e per il mantenimento del sistema immunitario, avendo proprietà immunostimolanti. Favorisce la crescita delle mucose, della pelle, delle ossa e dei denti, impedisce l'essiccamento della congiuntiva (per questo è detta anche antixeroftalmica) ed è implicata nella chimica della visione (figura 9). I bambini malnutriti nei paesi colpiti dalla carestia rischiano la carenza clinica di vitamina A, che si manifesta attraverso la cheratizzazione della congiuntiva, e successivamente della cornea, causando la cecità permanente. In questi paesi c'è inoltre un aumento della mortalità infantile per le malattie infettive dovute ad un'alterata immunocompetenza.

I sintomi di carenza di questa vitamina si presentano con fotofobia (intolleranza alla luce), calo della vista, stanchezza, secchezza della cute e della congiuntiva, congiuntivite, aumentata sensibilità alle infezioni, arresto della crescita con aumento del rischio di mortalità nei bambini, disturbi del fegato e possibili manifestazioni tumorali alla laringe, al polmone, alla vescica, all'intestino, allo stomaco e alla prostata.

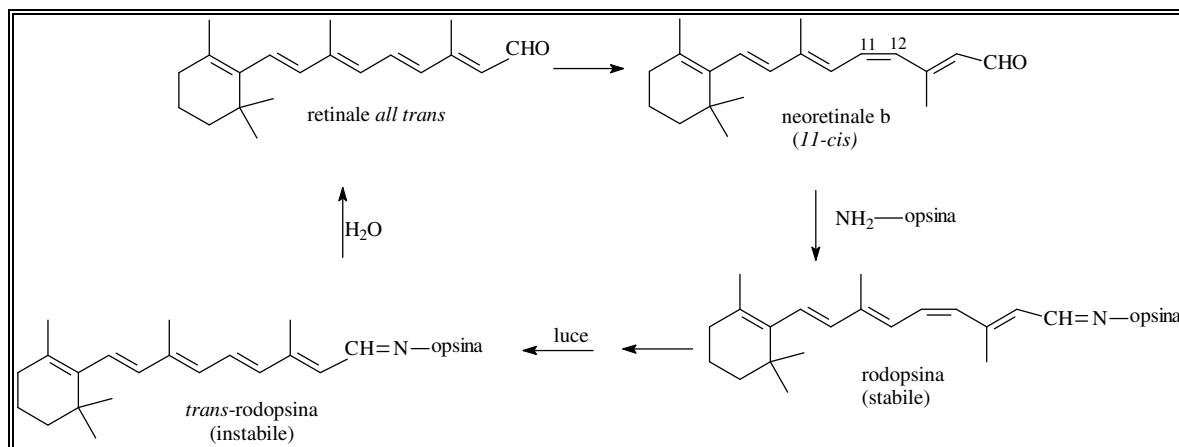


Figura 9: ruolo della vitamina A nella capacità visiva.

La rodopsina, una cromoproteina presente nei bastoncelli e nei cilindri della retina, è una cromoproteina che viene formata al buio: il retinolo, nella forma di 11-cis retinale o neoretinale b, si lega al buio ad una proteina chiamata opsina per dare la base di Schiff rodopsina (la porpora retinica). Quando la luce colpisce la retina il doppio legame cis della rodopsina isomerizza alla configurazione trans più stabile, ma in queste condizioni la base di Schiff non è più stabile e la rodopsina si idrolizza liberando l'opsina e l'11-trans retinale. Durante questa reazione si determina una differenza di potenziale che stimola il nervo ottico. Il retinale "tutto trans" viene convertito in retinolo "tutto trans", quest'ultimo nell'intermedio 11-cis retinolo che è a sua volta ritrasformato in 11-cis retinale; in questo modo la rodopsina si può ricostituire.

I bisogni sono valutati intorno a 0.5-0.6 *mg/die* nei lattanti, 0.6-0.8 nei bambini fino a 10 anni, 0.9-1.1 nell'adolescenza e 0.8-1.0 per gli adulti.

L'iperdosaggio da retinolo causa fenomeni di tossicità acuta e cronica, con sintomi simili a quelli dello scorbuto, compresa la teratogenicità nello sviluppo del feto. Normalmente, la tossicità deriva da un uso indiscriminato di supplementi farmaceutici, e non dal consumo alimentare delle usuali diete. Gli unici prodotti naturalmente presenti in natura che contengono un quantitativo sufficiente di vitamina A da indurre tossicità sono i fegati di animali in cima a lunghe catene alimentari, come i grandi pesci marini e i carnivori.

La vitamina A è relativamente stabile al calore ma è sensibile a luce ed agenti ossidanti, soprattutto come retinolo libero, mentre risulta più resistente quando è esterificato.

a. Fonti di vitamina A

Tutte le fonti naturali di vitamina A derivano fondamentalmente dai precursori carotenoidi con attività provitaminica A, i quali sono sintetizzati per fini metabolici esclusivamente da piante superiori e microrganismi fotosintetici. Carne e latte contengono vitamina A come conseguenza della conversione di carotenoidi, ingeriti dagli animali che si nutrono di foraggio e mais, in retinolo. I carotenoidi presenti nei prodotti lattiero-caseari, nel tuorlo d'uovo, nei molluschi e nei crostacei sono il risultato della deposizione nei tessuti animali di carotenoidi introdotti con la dieta e non metabolizzati.

La distribuzione di vitamina A in alcuni comuni alimenti è riportata in tabella 8.

Tabella 8: contenuto di vitamina A di vari alimenti [22].

Alimento	<i>µg retinolo/100 g di porzione edibile</i>
Latte vaccino intero pastorizzato	30
Latte scremato	1
Burro	958
Formaggio	364
Uova	190
Manzo	tracce
Agnello	6
Maiale	tracce
Pollo	11
Fegato agnello cotto	19700
Merluzzo	2
Aringhe	44
Aringhe grigliate	34
Sardine in scatola	6-9

Il fegato animale è una ricca fonte di vitamina A, poiché questo organo è il principale sito di stoccaggio nell'organismo della vitamina. Latte intero, burro, formaggio e uova sono importanti fonti dietetiche. Le parti edibili di pesce azzurro contengono moderate quantità di vitamina A, mentre il pesce bianco essendo più magro ne contiene solo tracce, a parte l'eglefino³.

Alcuni alimenti vengono addizionati di vitamina A, come la margarina, che è fortificata al fine di renderla equivalente al burro dal punto di vista nutrizionale, o alcuni tipi di latte (scremato, parzialmente scremato e il latte in polvere senza grassi), che negli USA e in Canada è obbligatorio fortificare con vitamina A.

Negli alimenti la vitamina A si ritrova in molteplici forme: nella maggior parte dei casi, il retinolo forma esteri con acidi grassi a lunga catena, particolarmente acido palmitico; fa eccezione il tuorlo d'uovo, nel quale il retinolo non esterificato rappresenta il maggior retinoide, seguito dalla retinaldeide e dai retinil esteri. Gli isomeri *cis* della vitamina A si trovano negli alimenti in diversa misura, ad esempio gli oli di fegato di pesce e le uova contengono rispettivamente il 35 e il 20% del retinolo totale in questa forma.

I retinil esteri indigeni sono disciolti nella frazione lipidica della matrice alimentare, che esercita un'azione protettiva dall'azione ossidante dell'ossigeno atmosferico grazie alle vitamine E, C e ad altri antiossidanti che vi possono essere presenti. L'acido ascorbico, ad esempio, è un efficace “*scavenger*” di tutte le specie reattive dell'ossigeno e quindi, riduce la perdita indotta dalla luce di vitamina A e dei suoi esteri in misura considerevole. In esaurimento degli antiossidanti, i retinil esteri diventano vulnerabili alla diretta ossidazione e soggetti all'attacco dei radicali liberi prodotti durante l'ossidazione dei lipidi.

Pertanto, i fattori che accelerano l'ossidazione lipidica, come l'esposizione all'aria, al calore, la presenza in tracce di certi metalli (in particolare di rame e, in misura minore, di ferro), il tempo di conservazione, porteranno anche alla distruzione dei composti della vitamina A.

Sia la lavorazione che lo stoccaggio dei cibi possono comportare la distruzione del 5-40% della vitamina A e dei carotenoidi. In assenza d'ossigeno e ad alte temperature, come sperimentato nella cottura o nella sterilizzazione dei cibi, le reazioni principali sono l'isomerizzazione e la frammentazione. In presenza di ossigeno la degradazione ossidativa porta ad una serie di prodotti, alcuni dei quali volatili; questa ossidazione spesso corre parallela all'ossidazione lipidica (processo

³ Pesce diffuso lungo le coste nordatlantiche, simile al merluzzo per la presenza di tre pinne dorsali e due anali e con una grossa macchia sopra le pinne pettorali.

di coossidazione). La velocità d'ossidazione è influenzata dalla pressione parziale dell'ossigeno, dall'attività dell'acqua, dall'esposizione alla luce, dalla temperatura, etc. I cibi liofilizzati sono particolarmente sensibili alla degradazione ossidativa.

Alcuni alimenti sono integrati con vitamina A sotto forma di preparati standard sintetici di esteri del retinolo, principalmente retinil palmitato. I preparati sono commercialmente disponibili sia come soluzioni in oli vegetali di alta qualità, contenenti aggiunte di vitamina E come antiossidante, sia essiccati in polvere. In questi ultimi, la vitamina A è dispersa in una matrice solida di gelatina e saccarosio o di gomma d'acacia e saccarosio. I preparati in polvere sono usati nei prodotti alimentari essiccati come latte in polvere, latte artificiale per neonati e alimenti dietetici.

Le preparazioni oleose sono usate per integrare alimenti a base di grassi come le margarine. Nelle margarine, infatti, i vari isomeri della vitamina A naturalmente presenti e le provitamine proprie degli oli originari crudi sono rimossi durante il processo di raffinazione. Perciò la vitamina A presente nella margarina finale è la combinazione di retinil esteri e di β -carotene aggiunti durante la lavorazione.

b. Vitameri A nel latte

I composti con attività vitaminica A sono presenti nel latte principalmente come retinoidi (retinolo e retinil esteri) ed in misura minore come carotenoidi (provitamine A). Le forme più abbondanti sono esteri del retinolo con acidi grassi saturi ed insaturi, mentre solo una piccola frazione è costituita da retinolo libero.

Molto poco è noto circa il profilo quali-quantitativo dei retinil esteri endogeni del latte bovino e di quello di altre specie animali. Una sola pubblicazione del 1989 [8] descrive lo studio, realizzato tramite HPLC-UV ($\lambda = 325 \text{ nm}$), del profilo dei retinoidi nel latte di diverse specie animali. In questo lavoro si stabiliva che il 99% della vitamina A nativa è presente nel latte vaccino sotto forma di esteri del retinolo con acidi grassi saturi e insaturi, mentre il restante 1% come retinolo libero. In tabella 9 sono riportate le distribuzioni, ottenute in questo studio, dei retinoidi nel latte bovino soggetto a differenti trattamenti termici, nel latte caprino e nel latte umano; sono riportati anche i dati ottenuti dall'analisi di olio di squalo e di fegato di merluzzo, scelti per essere fonti particolarmente ricche di vitamina A. Dal confronto tra latte vaccino, caprino e umano si dimostra che la distribuzione dei retinil esteri è specie-dipendente e differisce da quella trovata negli oli di pesce, usati come sorgenti di vitamina A. Ad ogni modo, emerge la presenza comune, tra il latte

delle differenti specie, di un gruppo di retinoidi: palmitato, stearato, oleato e linoleato, che rappresentano la maggior parte (> 75%) dei retinil esteri.

Il latte vaccino pastorizzato e quello UHT non mostrano nessuna differenza significativa nella distribuzione dei retinoidi: il rapporto tra i principali retinil esteri, cioè, rimane invariato in seguito ai trattamenti termici, nonostante la perdita di attività totale della vitamina A (tabella 9). Anche la produzione di latte in polvere o latte anidro lascia i principali retinil esteri nella stessa proporzione.

Esistono differenze significative nel profilo dei retinoidi tra gli onnivori (uomo e ratto) e gli erbivori (mucca e capra); ad esempio, la percentuale di retinil stearato, espressa come retinolo equivalenti, è maggiore nel latte umano (30.3%) e di ratto (19.4%) che nel latte vaccino e caprino, per i quali risultava simile (~9.5%).

In questo lavoro, è stato inoltre realizzato un confronto tra le distribuzioni dei retinil esteri e degli acidi grassi dei trigliceridi del latte bovino, caprino, umano e di ratto (tabella 10). In generale, il latte delle specie studiate evidenziava una forte correlazione tra gli acidi grassi esterificati come trigliceridi e quelli trovati come retinil esteri, caratteristica che è assente in altre matrici biologiche. La presenza di acidi grassi a catena media (C₈-C₁₄) nei retinoidi del latte, in particolare, assenti in altri tessuti o fluidi suggerisce quindi una relazione con l'assemblaggio dei trigliceridi: è probabile che entrambi condividano lo stesso pool metabolico di acidi grassi durante la loro sintesi all'interno della ghiandola mammaria. Tuttavia, i livelli inaspettatamente elevati di retinil linolenato (C18:3) e retinil pentadecanoato (C15:0) nel latte vaccino rimangono inspiegati; in particolare, è sorprendente l'elevato livello di retinil linolenato, vista la ridotta presenza dell'acido grasso nel pool di acidi dei trigliceridi.

Tabella 9: distribuzione dei retinil esteri, espressi come percentuale di equivalenti di retinolo (1 µg di retinolo viene detto retinolo equivalente), nel latte di diverse specie animali, nel latte trattato termicamente e in alcuni oli di pesci. Il retinil miristato (C14:0) e il retinil palmitoleato (C16:1) sono stati determinati come somma poiché nelle condizioni cromatografiche utilizzate coeludevano. Si aveva la coeluizione anche di retinil laurato (C12:0) e retinil arachidonato (C20:4). Tuttavia, il picco cromatografico nelle matrici analizzate è stato attribuito esclusivamente alla presenza di retinil laurato, dal momento che diversi studi nel ratto (sia in vivo che in vitro) hanno riportato l'assenza di sintesi di retinil arachidonato da parte dei microsomi epatici.

Campione	Retinolo	Retinil esteri												Esteri totali (I.U. per 100g)
		8:0	10:0	18:3	12:0	18:2	14:0 + 16:1	15:0	18:1	16:0	20:1	17:0	18:0	
Grasso di latte bovino anidro	2.2	1.1	3.5	6.2	1.2	6.2	2.5	3.5	23.1	37.6	0.5	1.9	10.8	3100
Latte bovino pastorizzato	0.4	1.7	4.3	8.5	1.5	7.3	2.1	6.0	20.3	36.7	0.4	2.2	8.4	89
Latte bovino UHT (2% di grasso)	0.4	3.2	2.4	8.3	1.8	8.5	2.2	6.2	21.5	34.0	0.5	2.5	8.3	53
Latte caprino	-	-	-	2.9	0.1	5.3	3.2	1.3	27.6	49.2	0.4	0.7	9.6	95
Latte umano maturo	0.4	0.3	0.4	0.5	0.4	10.3	2.1	1.3	18.9	32.3	0.2	1.9	31.7	103
Latte umano pastorizzato	-	-	0.3	0.8	0.5	13.0	2.1	1.7	18.8	32.5	0.3	1.5	28.9	93
Olio di squalo	-	-	0.5	-	-	-	1.0	1.2	-	92.7	-	0.7	2.6	23 × 10 ³
Olio di fegato di merluzzo	1.2	-	0.7	2.2	0.7	7.3	7.9	1.0	20.9	53.8	-	-	4.4	97 × 10 ³

Tabella 10: confronto tra le distribuzioni (esprese in percentuale) dei retinil esteri e degli acidi grassi dei trigliceridi nel latte di diverse specie animali.

	Acidi grassi dei retinil esteri e trigliceridi													
	4:0	6:0	8:0	10:0	12:0	14:0	15:0	16:0	16:1	17:0	18:0	18:1	18:2	18:3
Vitamina A nel latte vaccino	-	-	1.1	3.5	1.2	3.1	1.3	43.4	1.5	1.0	9.5	23.1	6.5	4.8
Lipidi totali nel latte vaccino	3.3	1.6	1.3	3.0	3.1	9.5	1.0	26.3	2.3	0.8	14.6	29.8	2.4	0.8
Vitamina A nel latte di capra	-	-	-	-	0.2	2.2	1.3	49.2	1.0	0.7	9.6	27.6	5.3	2.9
Lipidi totali nel latte di capra	2.6	2.9	2.7	8.44	3.3	10.3	1.0	24.6	2.2	1.0	11.5	28.5	2.2	1.0
Vitamina A nel latte umano	-	-	0.3	0.4	0.5	1.5	1.3	32.4	0.6	1.6	30.3	18.8	11.6	0.7
Lipidi totali nel latte umano	-	tracce	tracce	1.3	3.1	5.1	-	20.2	5.7	-	5.9	46.4	13.0	1.4
Vitamina A nel latte di ratto	-	-	3.5	8.7	4.8	6.3	-	33.8	2.0	-	19.4	11.1	11.2	tracce
Lipidi totali nel latte di ratto	-	-	1.1	7.0	7.5	8.2	-	22.6	1.9	-	6.3	26.7	16.3	0.8

In questa pubblicazione del 1989 sono stati studiati anche gli effetti del tempo (9 mesi) e della temperatura di conservazione (4, 15, 20, 30 e 40 °C) sulla distribuzione dei retinil esteri. Le determinazioni sono state effettuate sul latte vaccino intero in polvere fortificato con retinil acetato. Il retinil palmitato mostrava una maggiore resistenza alla temperatura più alta (40 °C); per il resto, nonostante il tempo e la temperatura di conservazione avessero influenza sulla riduzione di vitamina A totale, non modificavano significativamente la distribuzione dei retinoidi. Ciò porta alla conclusione che tutti i retinil esteri abbiano simile stabilità nel grasso del latte, osservazione sorprendente considerato il loro differente grado d'insaturazione.

c. Stabilità dei vitameri A nel latte

Più del 99% della vitamina A endogena del latte si trova sotto forma di retinil esteri di acidi grassi saturi e insaturi; la frazione rimanente è costituita da retinolo libero. Come già visto, i retinoidi sono sensibili alla luce e all'ossidazione e sono soggetti a isomerizzazione e degradazione durante la lavorazione degli alimenti. L'uso di contenitori trasparenti durante il trattamento, la manipolazione o lo stoccaggio del latte causano una parziale degradazione della vitamina A, che aumenta al diminuire del contenuto di grassi (tabella 11).

Tabella 11: *effetto del contenuto di grassi sulla perdita di retinil palmitato nel latte esposto a luce fluorescente [23].*

Type of Milk/Fat Content (%)	Percentage Loss of Vitamin A	
	2 h Exposure	4 h Exposure
Whole (3.4%)	18	37
Low-fat (2%)	26	44
Low-fat (1%)	28	49
Skim	31	57

Il retinolo è facilmente ossidato dall'ossigeno atmosferico, con conseguente perdita quasi totale dell'attività biologica e formazione del 5,6-epossido e del 5,8-furanossido, tra i principali prodotti di ossidazione; esso è inoltre estremamente sensibile nei confronti degli acidi che possono causare riarrangiamento dei doppi legami e deidratazione. I retinil esteri mostrano, invece, una maggiore stabilità del retinolo all'ossidazione.

Il trattamento di lavorazione subito, il contenuto di grasso, l'eventuale fortificazione, la confezione e le condizioni di conservazione influenzano la stabilità dei retinoidi nel latte. L'ossigeno disciolto e

l'ossigeno nello spazio di testa del contenitore sono responsabili della degradazione della vitamina A; inoltre, durante il processo di riscaldamento e la conservazione del latte, la vitamina A è potenzialmente soggetta all'isomerizzazione *trans-cis* come all'ossidazione, con conseguente diminuzione dell'attività biochimica (gli isomeri *cis* della vitamina A possiedono infatti una minore attività biochimica rispetto alla forma all-*trans*).

È stato verificato che il grado d'isomerizzazione della vitamina A dipende dal trattamento termico subito dal latte [24]. Il retinolo all-*trans* è l'isomero prevalente nel latte crudo ma:

- nel latte pastorizzato, trattato per 15 secondi a temperature tra 72 e 76 °C, il rapporto medio 13-*cis*:all-*trans* è intorno al 6.4%,
- nel latte UHT aumenta al 15.7%
- e nel latte sterilizzato arriva al 33.5%.

Il riscaldamento del latte intero pastorizzato in un forno a microonde domestico non causa, invece, perdita di vitamina A. Il congelamento a -20 °C permette di mantenere inalterato il contenuto di retinolo fino a 60 giorni di conservazione, ma dopo 4-8 mesi si verificava un decremento del 17-18% [25].

Nel latte sottoposto a trattamento UHT indiretto, a basso contenuto di grassi (2%), è stato osservato [26] che gli esteri all-*trans*, sia naturali che aggiunti, si degradano nel tempo, mentre gli isomeri *cis* mantengono le loro concentrazioni fino all'eventuale insorgenza del deterioramento del latte. Nel latte in polvere, è stato evidenziato un graduale incremento del rapporto *cis:trans* durante la conservazione in cartoni di Tetrapak a 37 °C e a 45 °C per 3 mesi, mentre a 27 °C non si verificano variazioni significative dalle concentrazioni iniziali.

La stabilità della vitamina A si dimostra temperatura-dipendente [27], con perdite significative durante la conservazione a 37 °C (dopo 12 mesi, tra il 34% e il 69%), sia per il latte liquido che in polvere destinato all'infanzia, mentre per temperature inferiori (20 e 30 °C) il decremento risulta lieve.

La presenza di grasso nel latte protegge la vitamina A dalla degradazione [28], con una differenza tra forme indigene e addizionate [29, 30]. Infatti, la vitamina A indigena, essendo localizzata nei globuli di grasso, è protetta dall'ossigeno più del retinil palmitato aggiunto che, disperso nella fase sierosa, è ossidato preferenzialmente per il maggior contatto con l'ossigeno.

Alcuni studi sul latte UHT hanno mostrato un legame tra la degradazione della vitamina A e l'ossigeno residuo nel campione, indicando l'ossidazione come uno dei meccanismi coinvolti. Il

latte UHT che ha subito il trattamento termico diretto ha un contenuto di ossigeno molto basso, mentre quello che ha subito il trattamento termico indiretto, senza disaeratore, dà un prodotto quasi saturo di ossigeno; in quest'ultimo la vitamina A si degrada più velocemente [26].

Anche la presenza di gruppi sulfidrilici liberi, resi disponibili a seguito del trattamento termico sulle siero-proteine, principalmente β -lattoglobuline, sarebbe responsabile di rapida degradazione della vitamina A [31]. A sostegno di questa tesi, è stato verificato che la degradazione di vitamina A risulta minore in campioni di latte in polvere scaldati a 82 °C per 30 *min* in confronto a quelli scaldati a 63 °C per 30 *min* [30].

Un distinto sapore di fieno è riscontrabile di frequente nel latte magro pastorizzato fortificato con vitamina A conservato in frigorifero per diversi giorni; tale sapore è associato senza dubbio alla presenza della vitamina A aggiunta nel latte, poiché non si riscontra nel latte non fortificato. In uno studio sul latte non grasso in polvere fortificato [32], l'intensità del gusto di fieno diventava sempre più debole all'aumentare del contenuto di grassi; perciò il grasso del latte maschera tale sapore. L'intensità del sapore di fieno aumentava durante la conservazione al diminuire dei livelli di vitamina A, indicando che tale sapore era dovuto a un prodotto della degradazione della vitamina; l'aggiunta di acido ascorbico impediva la degradazione della vitamina A nel latte scremato conservato a 4 °C, indicando che l'ossidazione della vitamina A era la probabile causa dello sviluppo del gusto di fieno. Due principali prodotti di ossidazione del retinil palmitato, ossia β -ionone e dihydroactinidiolide, hanno un leggero odore di fieno allo stato puro e possono essere responsabili di tale difetto di gusto.

1.3.3 I CAROTENOIDI

I *carotenoidi* sono un gruppo di pigmenti naturali, di colore dal giallo al rosso, privi di azoto e solubili nei grassi. Devono il loro nome ad una sostanza di color giallo-arancio, il *carotene*, scoperta nel 1831 nella radice di *Daucus carota* cioè nella comune carota. In natura sono sintetizzati dalle piante e da molti microrganismi, mentre gli animali possono metabolizzare i carotenoidi ma non sono in grado di sintetizzarli.

a. Struttura e biosintesi

I carotenoidi sono *terpenoidi*, di solito a 40 atomi di carbonio (tetraterpeni), formati da otto unità isopreniche C_5 unite testa-coda ad eccezione del centro dove un collegamento coda-coda inverte l'ordine, avendo come risultato quello di una molecola simmetrica. Questa peculiarità è dovuta al fatto che essi sono biosintetizzati (figura 10) mediante una reazione di condensazione coda-coda tra due molecole di *geranilgeranil pirofosfato* (intermedio C_{20}) per dare *fitoene*, un idrocarburo C_{40} che è il diretto precursore dei carotenoidi. Lo scheletro del fitoene può essere modificato per dare una grande varietà di carotenoidi C_{40} mediante:

- i) variazione del livello di idrogenazione;
- ii) ciclizzazione di una o di entrambe le estremità terminali per dare sette differenti gruppi illustrati in figura 11;
- iii) addizione di uno o più gruppi contenenti ossigeno (ossidrilico, carbonilico, epossidico);
- iv) perdita di una parte dello scheletro C_{40} .

I **carotenoidi** comprendono quindi:

- 1) i **caroteni**: idrocarburi altamente insaturi che possono essere aciclici come il licopene, monociclici come il γ - e il δ -carotene e biciclici come l' α -, il β -carotene;
- 2) le **xantofille**: derivati ossigenati dei caroteni, contenenti cioè gruppi *-idrossi* (luteina, zeaxantina, β -criptoxantina), *-cheto* (cantaxantina), *-epossi* (β -citraurina, violaxantina) e gli **acidi carotenici** (bixina, crocetina);
- 3) **apocaroteni**, **diapocaroteni** e **norcaroteni**: sono carotenoidi con una struttura dotata di meno di 40 atomi di carbonio per perdita di una parte terminale (apo) di entrambe le parti terminali (diapo) o di una porzione centrale (nor) dello scheletro C_{40} [33].

Di particolare importanza per l'uomo è la trasformazione degli α , β e γ -caroteni in vitamina A. Queste molecole, infatti, possiedono attività provitaminica A avendo almeno un anello β non sostituito e una catena polienica ad 11 atomi di carbonio. Il più potente è pertanto il β -carotene, mentre l' α -carotene e la β -criptoxantina esibiscono circa il 50% dell'attività vitaminica del β -carotene.

La luteina e la zeaxantina non sono provitamine A, ma rivestono un ruolo fisiologico importantissimo nell'uomo e negli animali costituendo il pigmento giallo nella macula della retina.

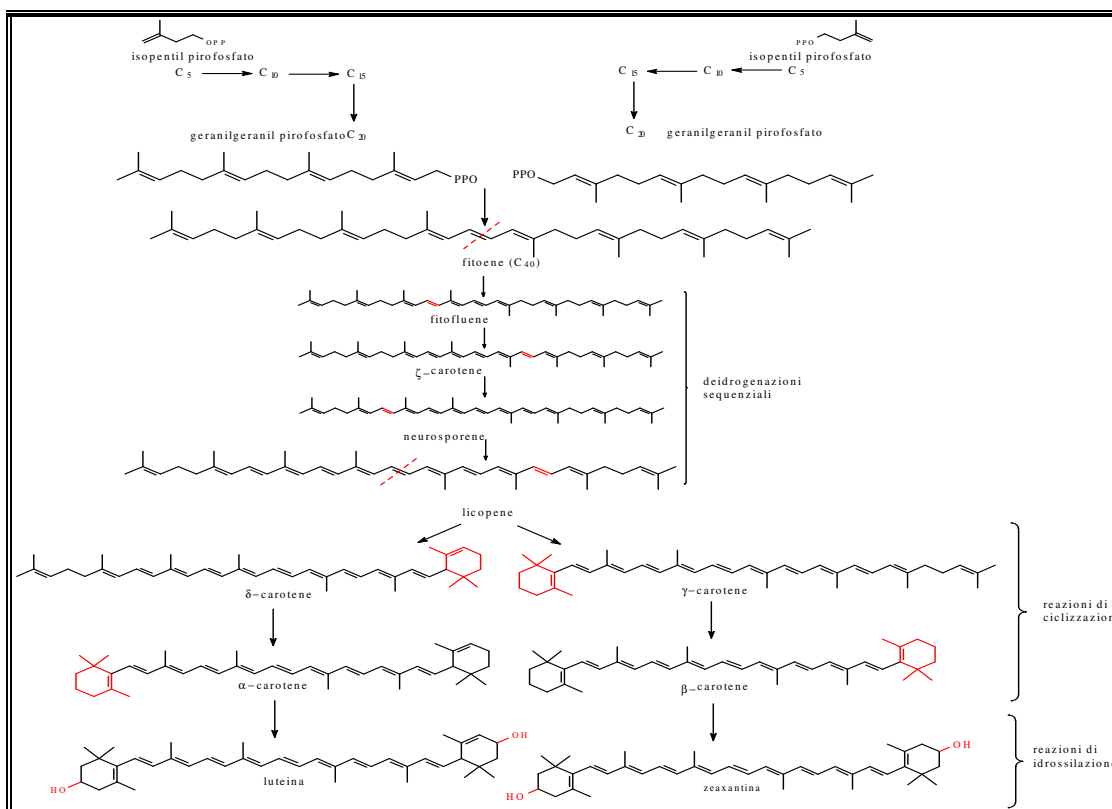


Figura 10: i carotenoidi, essendo isoprenoidi, sono sintetizzati a partire dal precursore C5 di base: l'isopentil pirofosfato (C_5) condensa con il suo isomero, il dimetilallil pirofosfato (C_3) per formare il geranil pirofosfato (C_{10}); l'aggiunta di una seconda molecola di isopentil pirofosfato dà il farnesil pirofosfato (C_{15}) che condensa con una seconda molecola di dimetilallil pirofosfato per dare geranilgeranil pirofosfato (C_{20}). Due molecole di geranilgeranil pirofosfato condensano tra loro coda a coda per dare una molecola simmetrica C40, il fitoene precursore dei carotenoidi; il primo carotenoide della serie, il licopene, si ottiene per reazioni di deidrogenazione successive, mentre successive reazioni di ciclizzazione, deidrogenazione, ossidazione etc. portano a centinaia di diversi tipi di carotenoidi naturali.

b. Nomenclatura

Tradizionalmente ai carotenoidi sono stati assegnati dei nomi non scientifici derivati dalla sorgente biologica da cui il carotenoide è stato isolato la prima volta. Una nomenclatura IUPAC semisistematica li denomina facendo precedere la radice “carotene” da due lettere greche che designano i due gruppi terminali [34]. Così, per esempio, il “*licopene*” è più correttamente definito come “ ψ, ψ -carotene”, il “ *β -carotene*” come “ β, β -carotene”, l’“ *α -carotene*” come “ β, ϵ -carotene”, il “ *δ -carotene*” come “ ϵ, ψ -carotene” e il “ *γ -carotene*” come “ β, ψ -carotene”. Variazioni nel livello di idrogenazione e la presenza di gruppi funzionali contenenti ossigeno sono indicate con gli stessi suffissi e prefissi utilizzati in chimica organica; per esempio la “*zeaxantina*” è indicata come “ β, β -

carotene-3,3'-diolo". Inoltre, anche per esprimere la chiralità dei carotenoidi otticamente attivi si usa il convenzionale sistema R,S.

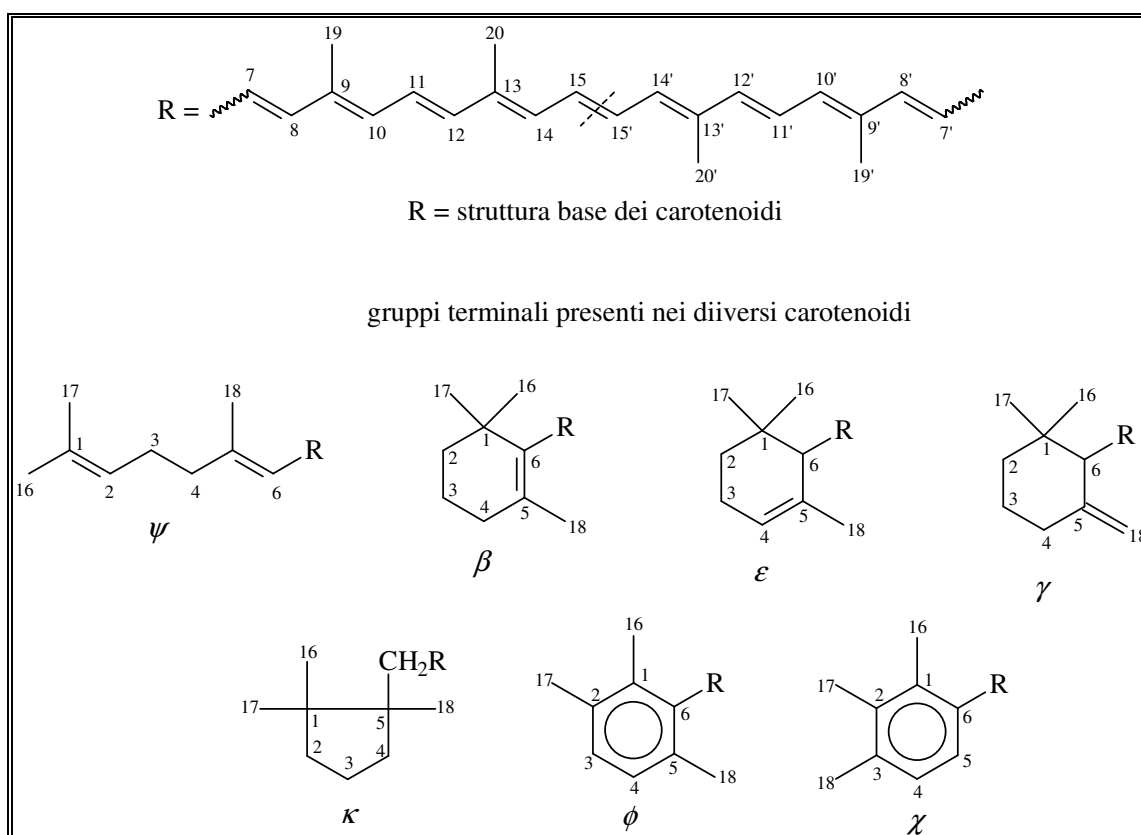


Figura 11: struttura base, gruppi terminali e numerazione dei carotenoidi.

c. Stereochimica

La caratteristica principale dei carotenoidi è il lungo sistema di doppi legami coniugati che formano la parte centrale della molecola; l'isomeria *cis-trans* (Z-E) in cui ciascun doppio legame potrebbe esistere e la rotazione attorno a ciascun legame singolo, fanno sì che, in linea teorica, ciascun carotenoide potrebbe avere un numero elevato di forme isomeriche (per es. 1056 per il licopene e 272 per il β -carotene) e di conformazioni. In realtà, solo un numero limitato di questi isomeri geometrici è stato riscontrato in natura: la presenza di un doppio legame con configurazione *cis* crea un maggiore ingombro sterico e risulta in genere termodinamicamente meno stabile della forma *trans* (ad es. per il licopene questo numero è "ridotto" a 72 e le sue forme *polycis*, riscontrate in alcune alghe e nei fiori di calendula, sono state denominate *prolicopeni*). Per questo motivo, la

maggior parte dei carotenoidi naturali sono presenti principalmente nella più stabile forma all-*trans*. Gli isomeri *monocis* e *policis* riscontrati in natura sono quelli che coinvolgono il doppio legame centrale 15, 15' (il fitoene in natura esiste proprio come 15Z-fitoene) e i doppi legami con un metile come sostituyente, quali il 9, 9', 13 e 13', in cui l'ingombro sterico è piccolo e che quindi risultano relativamente stabili; per esempio, insieme a β,β -carotene all-*trans* è facile trovare gli isomeri 9-*cis*-, 13-*cis*- e 15-*cis*-. Con altri doppi legami (7, 7', 11 e 11') la configurazione *cis* dà luogo a strutture meno stabili e difficili da riscontrare in natura: rari infatti sono gli isomeri 7-*cis*- e 11-*cis*- del β,β -carotene [34]. Per esposizione alla luce, al calore e ad altri agenti, possono però trasformarsi in una miscela di isomeri geometrici (*isomerizzazione trans-cis*), nei quali uno o più doppi legami si sono spostati in posizione *cis*.

Quando un carotenoide è presente come isomero *cis* o *di-cis* spesso si usa il prefisso “*neo*” per denominarlo.

Per la facilità con cui alcuni carotenoidi isomerizzano, in letteratura sono descritti *Z-isomeri* come prodotti naturali mentre, in realtà, sono degli artefatti; è importante evitare, quindi, durante il lavoro sperimentale alte temperature ed esposizione alla luce che incrementano la percentuale di isomeri *cis* [33].

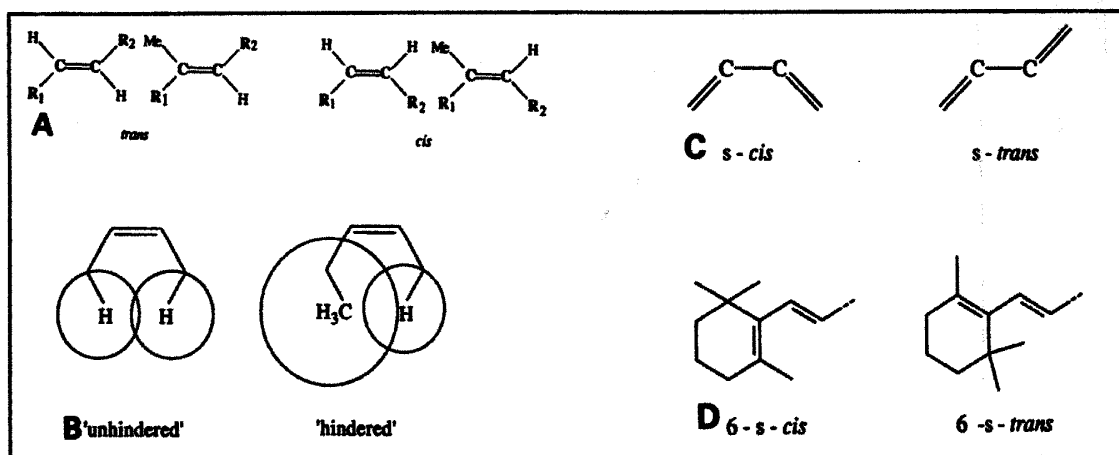


Figura 12: A) doppi legami *cis* e *trans* nei carotenoidi; B) doppi legami *cis* “ingombrati” e “non ingombrati” nella catena polienica dei carotenoidi; C) conformazioni *s-cis* e *s-trans* dei singoli legami nella catena polienica; D) conformazioni 6-*s-cis* e 6-*s-trans* dell’anello β dei carotenoidi.

La cristallografia a raggi X ha rivelato che i carotenoidi sono essenzialmente molecole lineari con una leggera distorsione a forma di S per alleviare la tensione sterica. Due sono i motivi responsabili di ciò: 1) un sistema coniugato è altamente stabilizzato quando i doppi legami sono coplanari, 2) l'ingombro sterico è ridotto quando ciascun singolo legame C-C è nella conformazione *s-trans*.

Nei carotenoidi ciclici, la rotazione attorno al singolo legame C6-C7 consentirebbe, in linea teorica, un numero infinito di angoli di torsione (*twisting*) tra l'anello e la catena principale. Nei carotenoidi con anello β , la coniugazione del doppio legame C5=C6 dell'anello con la catena polienica favorisce la coplanarità del sistema; ci sono due conformazioni coplanari possibili, la *6-s-cis* e la *6-s-trans*, ma entrambe generano un considerevole ingombro sterico. È noto che la conformazione *6-s-cis* è preferita, ma che risulta distorta di circa 40° rispetto al piano della molecola per alleviare la tensione sterica tra il metile sul C5 dell'anello e l'idrogeno sul C8 della catena (figura 12). Nei carotenoidi con anello ϵ , il doppio legame C4=C5 dell'anello non è in coniugazione con la catena polienica e la conformazione preferita è determinata dalla minore tensione sterica [35].

La tendenza degli isomeri *cis* a cristallizzare o ad aggregarsi è inferiore a quella dei corrispondenti isomeri *all-trans*; pertanto, gli isomeri *cis* possono essere più facilmente solubilizzati, assorbiti e trasportati in un sistema biologico rispetto alla loro controparte *all-trans*. Questo potrebbe essere il motivo per cui un carotenoide, presente come *all-trans* in un alimento, può essere ritrovato nel plasma sotto forma anche di isomeri *cis*.

d. Proprietà chimico-fisiche ed azione antiossidante

I carotenoidi costituiscono un gruppo di sostanze estremamente idrofobiche solubili in solventi apolari e insolubili in acqua; per questo motivo e per i loro caratteristici colori vengono anche chiamati *lipocromi*.

Il **colore dei carotenoidi** è dovuto al sistema cromoforico, costituito da un gran numero di doppi legami coniugati. Lo spettro elettronico di eccitazione di tali sistemi è utile per fornire informazioni sulla struttura e per le analisi qualitative e quantitative. Rilevante, nel caso dei carotenoidi, è la *transizione $\pi \rightarrow \pi^*$* , in cui uno degli elettroni di legame π è promosso ad un orbitale antilegame libero π^* . Gli elettroni π sono altamente delocalizzati e lo stato eccitato è relativamente a bassa energia, così l'energia richiesta per causare la transizione è relativamente piccola e corrisponde alla luce visibile nel range di lunghezze d'onda tra 400 e 500 nm. Per questo motivo i carotenoidi sono intensamente colorati di giallo, arancio o rosso; come il numero di doppi legami del sistema

cromoforico aumenta, cresce la lunghezza d'onda della luce assorbita, dando al composto un colore rosso sempre più intenso [36]. I carotenoidi mostrano in genere tre massimi distinti nello spettro visibile, la cui posizione delle λ dipende dal numero di doppi legami (figura 13); la struttura fine dello spettro si distingue meglio nel caso del licopene, aciclico, piuttosto che nel caso del β -carotene che, essendo biciclico, non risulta completamente planare a causa degli effetti sterici, responsabili di ostacolare la completa sovrapposizione degli orbitali π . In conseguenza di ciò, si osserva uno shift ipsocromico- cioè uno shift a λ più corte- per le principali bande di assorbimento. I gruppi contenenti ossigeno in coniugazione con il sistema polienico spostano le principali bande di assorbimento a λ più lunghe (effetto batocromico) con un simultaneo quenching della struttura fine dello spettro. I gruppi ossidrilici invece non hanno alcuna influenza sullo spettro. La variazione del solvente altera la posizione dei massimi di assorbimento: per esempio sostituendo esano con diclorometano si ha uno shift batocromico. Quando in un carotenoide naturale all-*trans* si verifica isomerizzazione di un doppio legame nella configurazione *cis*, si registra un piccolo shift nei massimi di assorbimento con una nuova, meno intensa, “*banda cis*” che si presenta come una spalla a lato della λ più corta [33].

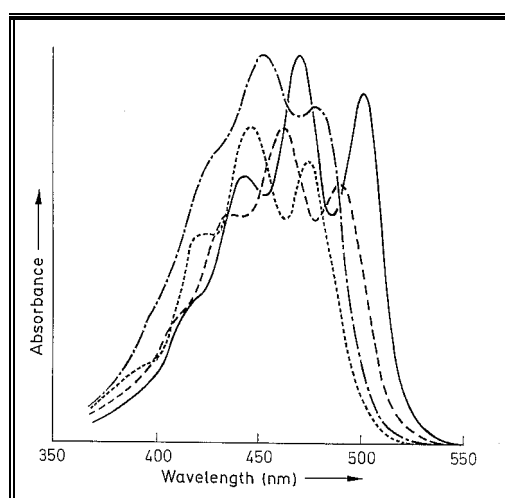


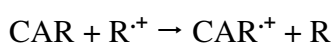
Figura 13: Spettri di eccitazione elettronica dei carotenoidi. —licopene; ---- γ -carotene; α -carotene; -.-.- β -carotene.

Le **proprietà fotochimiche** risiedono nella disposizione degli stati energetici eccitati a bassa energia (singoletto e tripletto); il caratteristico forte assorbimento della luce nella regione del visibile è attribuito ad una transizione dallo stato fondamentale S_0 al secondo stato eccitato di

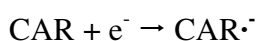
singoletto S_2 . S_2 può trasferire efficientemente la sua energia alla clorofilla che passa ad uno stato eccitato S_1 , attivo nella fotosintesi.

I carotenoidi svolgono anche una funzione foto-protettiva verso i danni causati da una combinazione della luce e dell'ossigeno, disattivando l'ossigeno singoletto 1O_2 , specie altamente reattiva [37]. Infatti, lo stato di tripletto di un carotenoide ha energia così bassa che risulta incapace di generare altre specie per trasferimento energetico perciò dissipa il suo surplus energetico sotto forma di calore all'ambiente circostante.

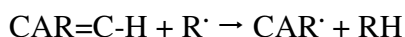
I carotenoidi formano con facilità specie radicaliche che possono essere generate in diversi modi: *ossidazione*: radicali con potere ossidante ed un alto potenziale redox possono rimuovere un elettrone dai carotenoidi e trasformarli in radical-cationi:



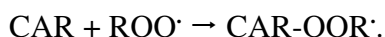
riduzione: l'aggiunta di un elettrone può portare ad un radical-anione:



asportazione di un atomo di idrogeno: l'asportazione di un atomo di idrogeno H^{\cdot} da un atomo di carbonio in posizione alilica alla catena polienica può generare, per scissione omolitica del legame C-H, una specie radicalica neutra stabilizzata per risonanza:



addizione: l'aggiunta di una specie radicalica, quale un radicale perossidico o ossidrilico, alla catena polienica di un carotenoide potrebbe generare un addotto radicalico:

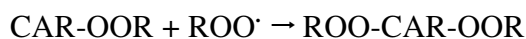
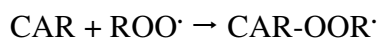


Nei radicali carotenoidi, l'elettrone spaiato è altamente delocalizzato sull'intero sistema polienico coniugato [13, 38].

La catena polienica dei carotenoidi è un sistema ricco di elettroni e altamente reattivo, suscettibile all'attacco di reagenti elettrofilici, che è responsabile dell'instabilità dei carotenoidi verso l'ossidazione ed è l'importante caratteristica di queste molecole in relazione alla chimica dei radicali liberi. Carotenoidi puri, anche nello stato cristallino, sono suscettibili all'ossidazione se conservati in presenza di tracce di ossigeno. In vivo, i carotenoidi sono usualmente stabilizzati dalle proteine e da altre specie molecolari in loro stretta prossimità; tuttavia, anche in queste condizioni

risultano ancora suscettibili al danno ossidativo. La rottura dei carotenoidi è usualmente indicata come *sbiancamento*, cioè perdita del colore dovuta alla distruzione del cromoforo [36].

È stato verificato che i carotenoidi reagiscono con radicali perossidici per formare un addotto stabilizzato per risonanza che a sua volta reagisce con un altro radicale perossidico per formare un addotto non-radicalico [39]:



A basse concentrazioni di ossigeno, questo processo dovrebbe consumare i radicali perossidici e il carotenoide agire come un antiossidante che interrompe la catena; questo è l'altro meccanismo d'azione proposto per spiegare l'**azione antiossidante** di queste molecole.

La **instabilità** dei carotenoidi nei confronti di luce, ossigeno e calore è dovuta al caratteristico sistema coniugato ed è causa della maggior parte dei problemi relativi alla manipolazione ed al trattamento di queste sostanze. Per alcuni carotenoidi possono risultare dannose anche condizioni acide o alcaline. Alcuni di questi fattori possono portare alla degradazione e/o trasformazione dei carotenoidi che sono presenti nel campione. Per questa ragione sono necessarie diverse precauzioni quando si maneggiano i carotenoidi, per esempio l'uso di antiossidanti, la protezione dalla luce diretta durante gli esperimenti, l'evaporazione a bassa temperatura sotto flusso di azoto o argon e la conservazione al buio, possibilmente sotto argon o azoto, a -20 °C. L'uso di antiossidanti è, comunque, una delle strategie più comuni per prevenire l'ossidazione durante l'estrazione ed il trattamento dei campioni, specialmente quando questi vengono saponificati per ottenere i carotenoidi liberi. Etossichinina, pirogallolo, acido ascorbico e ascorbato di sodio sono alcuni esempi di antiossidanti utilizzati, anche se l'idrossitoluene butilato (BHT) è sicuramente il più diffuso. Normalmente il BHT è utilizzato a concentrazioni tra 0.01% e 0.1% [40].

e. distribuzione in natura

Più di 600 carotenoidi, non includendo gli isomeri *cis* e *trans*, sono stati isolati e caratterizzati a partire da fonti naturali, quali piante, alghe, batteri, lieviti, funghi e mondo animale. Gli animali compreso l'uomo, non sono però in grado di sintetizzare questi composti, se ne riforniscono quindi dal mondo vegetale, attraverso l'alimentazione, e poi li modificano.

I carotenoidi sono responsabili, per fare qualche esempio, della colorazione rossa dei pomodori (licopene), di quella gialla del mais (zeaxantina), dello zafferano (crocetina) e delle foglie autunnali (luteina). Nei frutti acerbi non sono visibili, ma si formano durante il processo di maturazione, in presenza di ossigeno, esibendo le caratteristiche colorazioni dal giallo al rosso. Contrariamente a quello che si potrebbe pensare sono presenti anche nelle foglie, negli steli e nell'erba dove il loro colore viene mascherato da quello della clorofilla che affiancano nel processo fotosintetico. Nei vegetali a foglia verde si trovano nei cloroplasti, assieme alla clorofilla, generalmente complessati con proteine e grassi. Il β -carotene è il tipo predominante nella maggior parte delle foglie verdi, e tanto più elevata è la sua concentrazione, tanto più intensa appare la colorazione delle parti che lo contengono. In autunno quando il contenuto di clorofilla diminuisce, i carotenoidi manifestano la loro presenza, e le foglie assumono i colori caldi e vivaci caratteristici della stagione.

La concentrazione dei carotenoidi nel latte bovino [17] dipende anche dalla natura e dalla quantità del foraggio consumato con variazioni correlate alla stagione (per esempio, la luce del sole diminuisce la concentrazione dei carotenoidi nell'erba poiché sono sostanze fotosensibili). La luteina è il carotenoide più abbondante, seguito da *all-trans*- β -carotene, zeaxantina, 9-*cis*- β -carotene, 13-*cis*- β -carotene, α -carotene e β -criptoxantina.

1.4 METABOLISMO DELLA VITAMINA A E DEI CAROTENOIDI

Il quantitativo giornaliero di vitamina A viene introdotto nell'organismo umano per il 75% direttamente sotto forma di esteri del retinolo (fonti animali), mentre il restante 25% proviene da alcuni precursori con attività provitaminica A, appartenenti alla classe dei carotenoidi (fonti vegetali), di cui il principale rappresentante è il β -carotene, noto come provitamina A (figura 14). Un'accurata stima del contenuto di vitamina A di un alimento dovrebbe includere una dettagliata analisi dei suoi carotenoidi precursori.

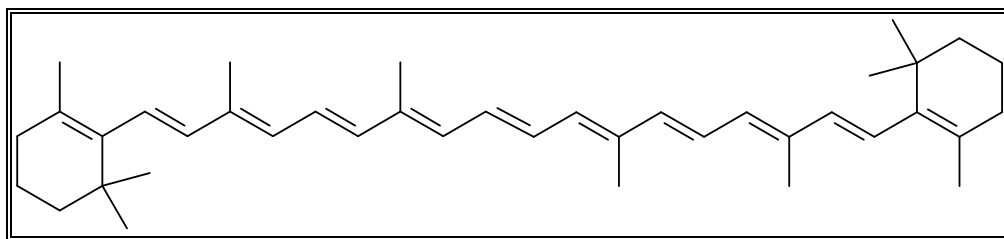
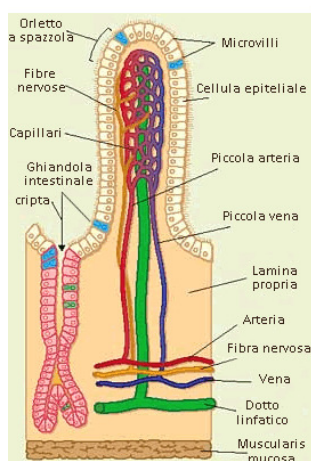


Figura 14: il β -carotene è un idrocarburo polienico costituito da quattro residui isoprenici polimerizzati e ciclizzati agli estremi della catena.

In figura 15 sono mostrati schematicamente l'assorbimento intestinale del β -carotene e dei retinil esteri, e i principali eventi metabolici nell'enterocita⁴.

⁴ Si calcola che la mucosa intestinale sia ricoperta da circa 40 milioni di villi, più o meno 18-40 per mm^2 . Ogni villo è costituito da un asse connettivale tappezzato da un singolo strato di cellule assorbenti, la cui membrana - rivolta verso il lume - presenta delle sottili estroflessioni citoplasmatiche a dito di guanto. La particolare conformazione delle cellule assorbenti, note anche come enterociti, ha lo scopo di aumentare al massimo le capacità digestive e di assorbimento dell'organismo.



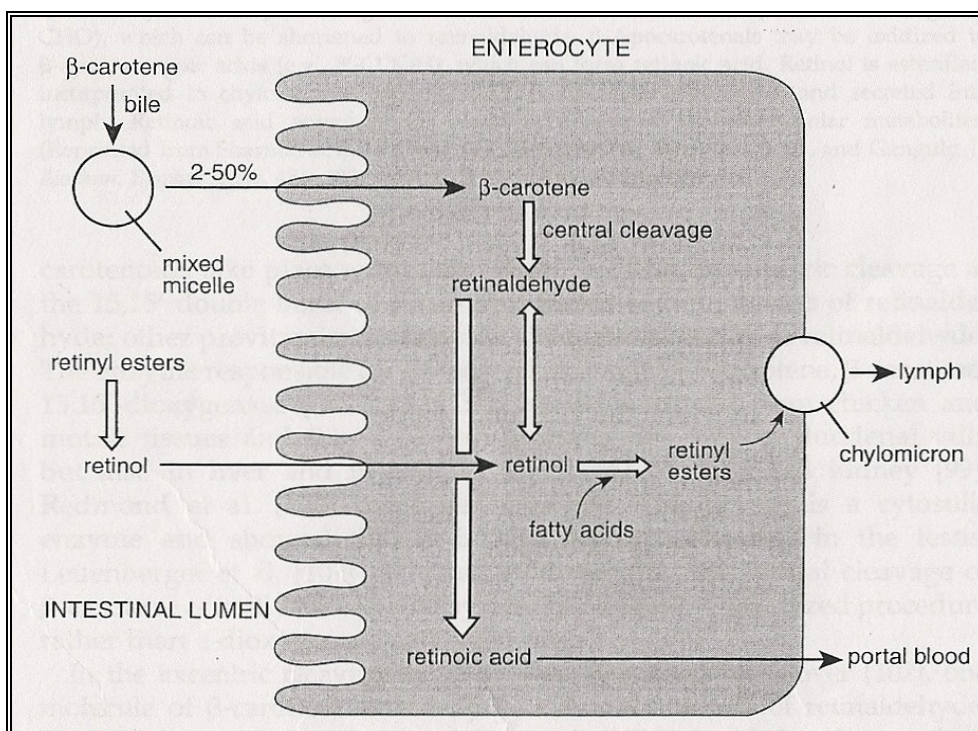


Figura 15: assorbimento intestinale e metabolismo del β -carotene e dei retinil esteri.

a. Assorbimento

L'assorbimento della vitamina A e dei precursori carotenoidi avviene in presenza di grassi ed acidi biliari; dipende, quindi, dal corretto funzionamento della digestione e dall'assorbimento del grasso assunto con la dieta. I retinil esteri ed i carotenoidi ingeriti sono liberati dalle loro associazioni con le membrane e le lipoproteine grazie all'azione della pepsina nello stomaco e degli enzimi proteolitici nell'intestino tenue. Nello stomaco, i carotenoidi liberi e i retinil esteri si associano in globuli di grasso che poi passano nel duodeno. Qui si verifica un'estesa idrolisi dei retinil esteri, catalizzata principalmente da un'idrolasi pancreatica non specifica che può agire su una grande varietà di esteri. Le xantofille esterificate sono invece idrolizzate dalle esterasi.

In presenza di sali biliari, i globuli di grasso vengono rotti in globuli più piccoli da una grande varietà di lipasi pancreatiche e ciò li rende più facilmente digeribili; al di sopra di una concentrazione critica di sali biliari formano micelle che inglobano i prodotti della lipolisi, il retinolo e i carotenoidi formando micelle miste. Il retinolo e i carotenoidi contenuti nelle micelle miste attraversano la parete del lume intestinale e sono rilasciati come risultato della dissociazione delle micelle.

Le concentrazioni fisiologiche di retinolo, derivate dalle fonti alimentari naturali, sono assorbite grazie ad una diffusione facilitata mediata da un trasportatore; a concentrazioni maggiori, prevale un processo di semplice diffusione. L'assorbimento del retinolo mediato dal trasportatore mostra specificità verso l'all-*trans*-retinolo; l'uptake del 9-*cis*- e del 13-*cis* retinolo e della retinaldeide ha luogo per semplice diffusione.

Studi *in vitro* hanno suggerito che la captazione dei carotenoidi ad opera degli enterociti è un processo facilitato; ad ogni modo, nessuna proteina trasportatrice è stata ancora identificata per i carotenoidi.

All'interno degli enterociti, il retinolo si lega con un rapporto molare 1:1 alla proteina cellulare cellular retinol binding-protein type II (CRBP-II), che si trova esclusivamente e abbondantemente in queste cellule. Il retinolo legato a tale proteina viene esterificato con acidi grassi saturi a lunga catena, preferenzialmente acido palmitico (C16:0). Questa esterificazione usa un differente pool di acidi grassi, e quindi differenti enzimi, che vengono utilizzati per la sintesi dei trigliceridi.

La conversione dei precursori carotenoidi a retinoidi avviene nella mucosa intestinale per scissione ossidativa, sia simmetrica che asimmetrica, all'interno dell'enterocita. Uno schema del metabolismo intestinale del β -carotene è mostrato in figura 16.

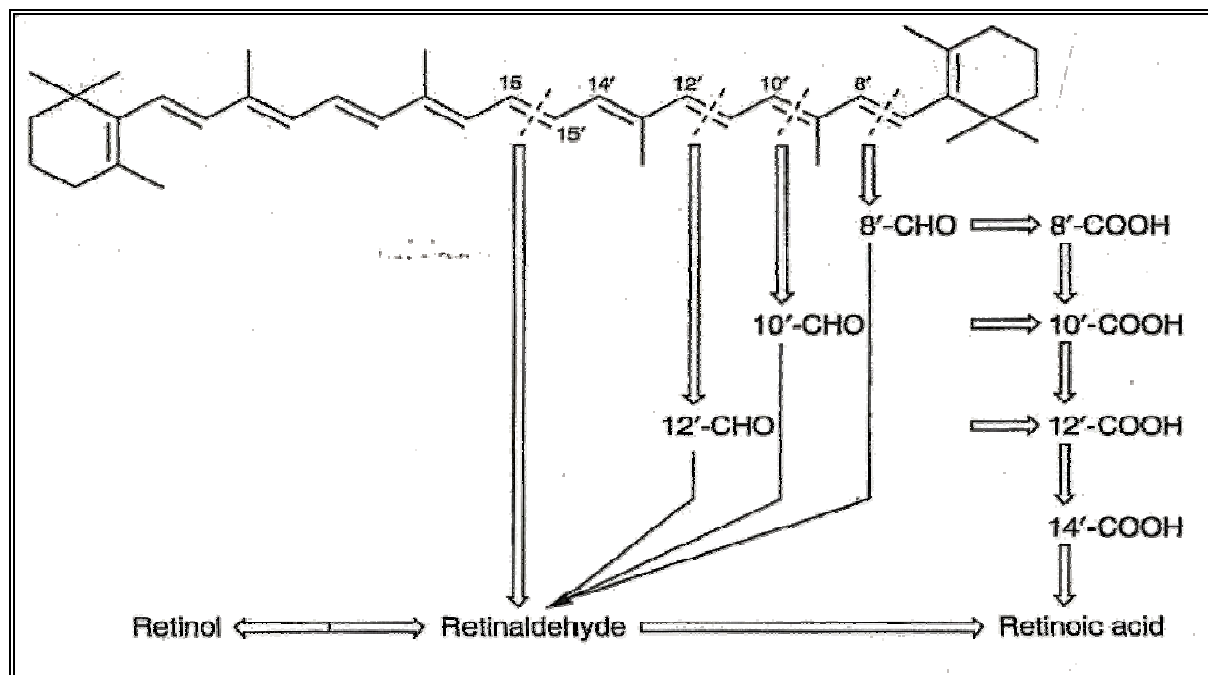


Figura 16: metabolismo intestinale del β -carotene.

La scissione ossidativa simmetrica nel doppio legame centrale 15,15' del β -carotene produce direttamente due equivalenti di retinaldeide; la riduzione biochimica del carbonile aldeidico porta alla vitamina A1 (figura 17); altri carotenoidi producono, invece, un solo equivalente di retinaldeide. L'enzima responsabile della scissione centrale del β -carotene è l'enzima citosolico β -carotene-15,15'-diossigenasi.

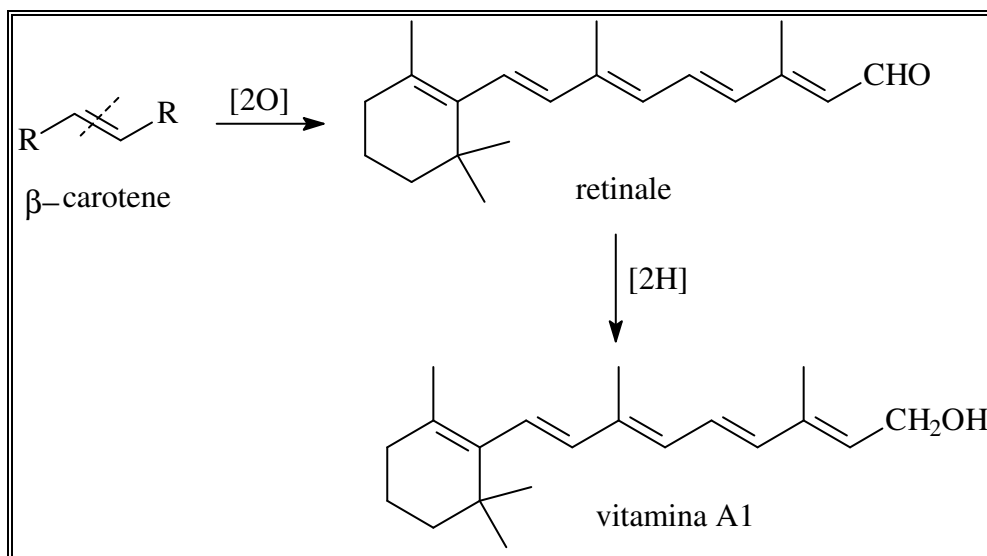


Figura 17: trasformazione del β -carotene in vitamina A mediante la scissione simmetrica.

La scissione di altri doppi legami del β -carotene forma β -apocarotenali che possono essere trasformati in retinaldeide; la scissione del doppio legame terminale 7',8' ad esempio porta al β -apo-8'-carotenale (8'-CHO). In questi casi una molecola di β -carotene produce una molecola di retinaldeide. I β -apocarotenali possono essere ossidati ad acidi β -apocarotenici (ad es. 8'-COOH), per formare acido retinoico.

La maggior parte della retinaldeide formata dai carotenoidi si lega alla proteina cellulare CRBP-II e viene reversibilmente ridotta a retinolo dalla retinaldeide riduttasi. Il complesso risultante retinolo-CRBP-II è poi usato come substrato per l'esterificazione. La bioconversione dei caroteni a retinoidi è regolata in funzione della necessità di vitamina A: è stato infatti dimostrato che l'attività della diossigenasi era più elevata nei ratti [41] e nei criceti [42] che seguivano una dieta povera di vitamina A rispetto a quelli nutriti normalmente.

L'attività di tale enzima è influenzata anche dalle proteine e dai grassi assunti con la dieta. La riduzione dell'attività dell'enzima in risposta all'insufficienza proteica può spiegare la ridotta

conversione del β -carotene a vitamina A nella parete intestinale dei ratti che assumono una scarsa quantità di proteine [43]. È stato riportato [44], inoltre, che alimentando i ratti con una dieta ricca in acidi grassi polinsaturi (AGPI) aumentava sia l'attività della β -carotene-15,15'-diossigenasi sia il livello di CRBP-II nell'intestino, mentre questo doppio incremento non era osservato nel caso di una dieta ricca in acidi grassi saturi; i dati suggeriscono che la diossigenasi e la proteina CRBP-II sono regolati da un meccanismo comune che coinvolge gli AGPI. Poiché la CRBP-II è coinvolta nella conversione della retinaldeide a retinolo, i simultanei incrementi dell'attività enzimatica e del livello di proteina aumentano la capacità totale dell'intestino di convertire il β -carotene a vitamina A [45].

b. Uptake epatico e immagazzinamento della Vitamina A

I retinil esteri così formati, accompagnati da piccole quantità variabili di carotenoidi immutati, sono secreti dagli enterociti nel sangue attraverso il sistema linfatico come componenti dei chilomicroni. Le concentrazioni plasmatiche di chilomicroni, in genere, sono massime 4-5 h dopo un pasto. I chilomicroni circolanti subiscono lipolisi e i risultanti chilomicroni residui sono assorbiti dal fegato e in misura minore dai tessuti extraepatici. Nel fegato, i retinil esteri incorporati nei chilomicroni residui sono idrolizzati e la maggior parte del retinolo è trasferito dagli epatociti alle cellule stellate del fegato, dove viene esterificato nuovamente ed immagazzinato. Il fegato può accumularne grosse riserve, così da sopperire ai bisogni per un lungo periodo di tempo. Sia il retinolo derivante dai precursori carotenoidi ingeriti, sia quello ingerito come tale, è immagazzinato nel fegato e viene secreto nel circolo ematico quando necessario.

c. Trasporto plasmatico di retinolo e carotenoidi

Su richiesta, i retinil esteri immagazzinati nel fegato vengono idrolizzati e il retinolo è rilasciato nel circolo ematico legato ad una particolare proteina di sintesi epatica: la retinol binding protein o RBP. Nel plasma, il retinolo-RBP si combina con una proteina chiamata transtiretina e il complesso risultante distribuisce, così, retinolo alle cellule dei tessuti che necessitano di vitamina A. La concentrazione plasmatica di vitamina A è mantenuta abbastanza costante attraverso uno scambio omeostaticamente controllato della vitamina tra plasma, fegato e tessuti extraepatici.

Il retinolo citoplasmatico è soggetto a vari destini metabolici, compresa l'ossidazione ad acido retinoico, il quale, una volta giunto nel nucleo cellulare, induce la sintesi di proteine attraverso il

diretto controllo della trascrizione genica, in collaborazione con molte altre proteine regolatrici. Questo tipo di azione permette di paragonare la vitamina A (nella forma del metabolita acido retinoico) ad un ormone, es. steroideo e tiroideo.

L'eliminazione della vitamina A avviene per via urinaria previa trasformazione in composti solubili.

I carotenoidi residui non sono accumulati nelle cellule epatiche: essi sono rilasciati in circolazione come componenti di lipoproteine a densità molto bassa (very low density lipoproteins, VLDL), le quali sono successivamente impoverite del loro contenuto lipidico a lipoproteine a bassa densità (low density lipoproteins, LDL). A digiuno, le LDL sono le principali trasportatrici di carotenoidi non polari. I carotenoidi rilasciati dalle lipoproteine, specialmente LDL, sono assorbiti da molti tessuti, in particolare tessuti adiposi, dove sono accumulati.

1.4.1 FATTORI DI CONVERSIONE PER LA VITAMINA A

Fino a poco tempo fa, la vitamina A negli alimenti è stata espressa in unità internazionali (UI). Questa è ancora la misura generalmente utilizzata sulle etichette di alimenti e integratori. Tuttavia, è difficile calcolare il totale di vitamina A nella dieta in termini di UI, in quanto sia l'assorbimento che la conversione dei carotenoidi, rispetto al retinolo, sono variabili. Il retinolo equivalente (μg RE) è stato sviluppato dalla Food and Agriculture Organization delle Nazioni Unite nel 1967. Più recentemente, nel 2001, l'Istituto di Medicina degli Stati Uniti ha proposto come unità l'attività retinolo equivalenti (RAE) per gli apporti dietetici di riferimento (μg RAE). I due sistemi sono confrontati in tabella 12.

Tabella 12: confronto dei fattori di equivalenza per l'interconversione di vitamina A e precursori carotenoidi [46].

Retinol Equivalent (RE)	Retinol Activity Equivalent (RAE)
1 retinol equivalent (μg RE)	1 retinol activity equivalent (μg RAE)
=1 μg of all- <i>trans</i> -retinol	=1 μg of all- <i>trans</i> -retinol
=2 μg of supplemental all- <i>trans</i> - β -carotene	=2 μg of supplemental all- <i>trans</i> - β -carotene
=6 μg of dietary all- <i>trans</i> - β -carotene	=12 μg of dietary all- <i>trans</i> - β -carotene
=12 μg of other dietary provitamin A carotenoids	=24 μg of other dietary provitamin A carotenoids

Nel sistema basato sui RE, 1 μg di retinolo viene detto *retinolo equivalente* e corrisponde a 3,33 UI. Un retinolo equivalente è fornito da 6 μg di β -carotene e 12 μg di altri caroteni.

Nel nuovo sistema basato sui RAE, invece, il rapporto per il β -carotene proveniente dagli alimenti è fissato a 12:1 e quello per gli altri carotenoidi con attività provitaminica A è fissato a 24:1. In altre parole, 1 μg di retinolo è nutrizionalmente equivalente a 12 μg di β -carotene o a 24 μg di altri precursori carotenoidi. Il rapporto 12:1 per il β -carotene assunto con la dieta deriva dalle seguenti osservazioni sperimentali:

- (1) 6 μg di β -carotene provenienti da una dieta mista sono nutrizionalmente equivalenti ad 1 μg di β -carotene in olio;
- (2) 2 μg di β -carotene in olio producono 1 μg di retinolo.

Il rapporto 24:1 per gli altri carotenoidi è basato sull'osservazione che l'attività provitaminica A della β -criptoxantina e dell' α -carotene è circa la metà rispetto a quella del β -carotene. Un rapporto di 12:1 per il β -carotene è stato calcolato in base a dati relativi a persone sane in paesi sviluppati. Studi condotti in Indonesia e Vietnam indicano un rapporto più basso di 21:1; ciò indica che le popolazioni dei paesi in via di sviluppo non sono in grado di sopperire, dalle attuali fonti alimentari, alle loro esigenze di vitamina A.

1.4.2 BIODISPONIBILITA'

Biodisponibilità è un termine ambiguo e viene frequentemente valutata dall'efficienza di assorbimento. Nel caso dei carotenoidi, la biodisponibilità è definita come la percentuale di carotenoidi ingeriti secreta nella circolazione generale e resa disponibile per la captazione da parte dei tessuti. Altri due termini correlati sono stati introdotti per i carotenoidi: bioaccessibilità e bioefficacia. La bioaccessibilità è definita come la frazione di carotenoidi trasferita durante la digestione dalla matrice alimentare alle micelle miste e così resa accessibile per l'assorbimento. La bioefficacia definisce l'efficienza percentuale con la quale il β -carotene ingerito è assorbito e convertito a retinolo nell'organismo. Dal momento che 1 μmol di β -carotene teoricamente potrebbe formare 2 μmol di retinolo, il 100 % di bioefficacia significherebbe che 1 μmol di β -carotene assunto con la dieta (0.537 μg) viene assorbita al 100 % e convertita al 100 % in retinolo, producendo 2 μmol di retinolo (0.572 μg). Perciò, la quantità di β -carotene richiesta per formare 1 μg di retinolo dovrebbe essere $0.537/0.572 = 0.94 \mu\text{g}$.

Quando vengono consumati pasti contenenti quantità naturali di vitamina A e precursori carotenoidi, i retinoidi sono assorbiti con un'efficienza del 70-90% rispetto al 20-50% per le provitamine. L'efficienza di assorbimento della vitamina A rimane alta (60-80%) quando il quantitativo ingerito aumenta al di là dei livelli fisiologici, mentre l'efficienza di assorbimento delle provitamine scende drammaticamente a meno del 10%, fatto indicativo di un processo saturabile.

1.5 RUMINANTI

Quattro tra le specie animali oggetto di questo lavoro (mucca, bufala, capra, pecora) sono erbivori ruminanti [47]; essi si distinguono per l'anatomia dell'apparato digerente e, di conseguenza, per il processo digestivo, rispetto alla famiglia Equidae, di cui la quinta specie selezionata per questa tesi (asina) fa parte.

1.5.1 APPARATO DIGERENTE

In generale, l'apparato digerente è composto dal canale alimentare, che inizia con la bocca e termina con l'ano, e da numerose ghiandole che mediante dotti versano i loro secreti nel canale stesso. Il canale alimentare è costituito da una parte prediaframmatica e una retrodiaframmatica. La prima serve per l'assunzione degli alimenti e comprende bocca, faringe e quasi tutto l'esofago, che conducono gli alimenti fino allo stomaco e li preparano per la digestione gastrica. La seconda, alloggiata nella cavità addominale e in piccola parte nelle pelvi, ha un tratto digestivo comprendente l'ultima parte dell'esofago, stomaco, intestino (tenue e crasso) e ghiandole annesse (fegato e pancreas), che provvede alle trasformazioni indispensabili per l'utilizzazione degli alimenti e la formazione dei residui, e un tratto espulsivo formato dall'ultimo segmento dell'intestino, che porta all'esterno i residui alimentari inutilizzati.

L'apparato digerente dei carnivori risulta molto più semplice e corto rispetto a quello degli erbivori a causa della "facilità" della digestione della carne nei confronti dei vegetali. In tabella 13 è illustrata la lunghezza del tubo digerente rispetto a quella corporea in alcuni mammiferi.

Tabella 13: *lunghezza dell'apparato digerente in diverse specie in rapporto alla lunghezza dell'animale.*

Specie	Rapporto
Ovicaprini	1:27
Bovini	1:20
Suini	1:14
Equini	1:12
Canidi	1:6
Felini	1:4

L'asino [48] è un erbivoro monogastrico, il cui apparato digerente ha capacità di circa 120 L. Lo stomaco si presenta di dimensioni piuttosto ridotte (8 - 10 L), mentre il tratto gastro-intestinale misura 18-20 volte la lunghezza dell'intero corpo; questa specie è inoltre caratterizzata da un particolare sviluppo dell'intestino cieco nel quale la flora batterica degrada i carboidrati vegetali strutturali (in particolare la cellulosa) consentendone l'assimilazione. Questo adattamento del sistema digerente distingue nettamente gli equidi dai ruminanti, in cui è invece fondamentale l'adattamento funzionale di tasche gastriche (il rumine) in cui avviene la prima fermentazione del materiale vegetale, che successivamente viene rigurgitato e rimasticato.

Infatti, mentre negli animali monogastrici lo stomaco è unico (carnivori, onnivori, erbivori non ruminanti), nei ruminanti o poligastrici è formato da un *complesso stomacale* costituito da tre (camelidi) o quattro (bovini, ovini, caprini) organi distinti (figura 18). Questi ultimi comprendono i tre prestomaci *rumine*, *reticolo* e *omaso*, chiamati anche diverticoli esofagei perché istologicamente più simili all'esofago, e l'*abomaso* che è il vero stomaco, corrispondente a quello dei monogastrici. Come esempio, in figura 19 è descritto in dettaglio il complesso stomacale di bovino.

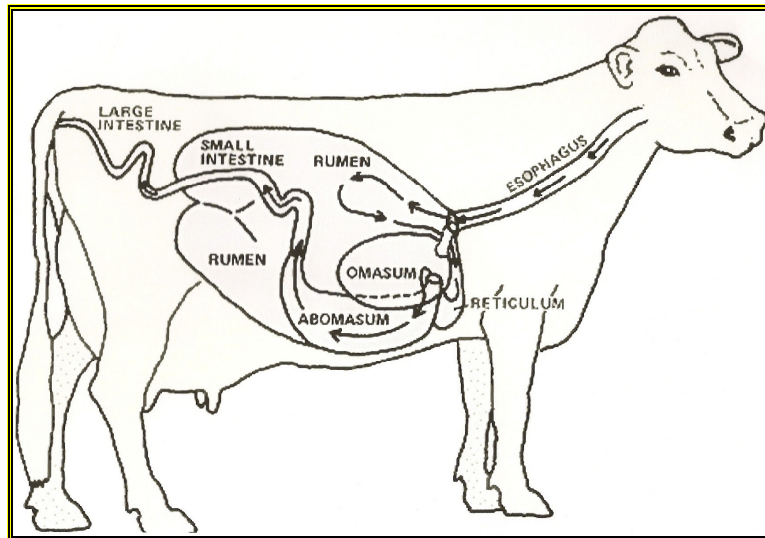


Figura 18: complesso stomacale in un bovino.

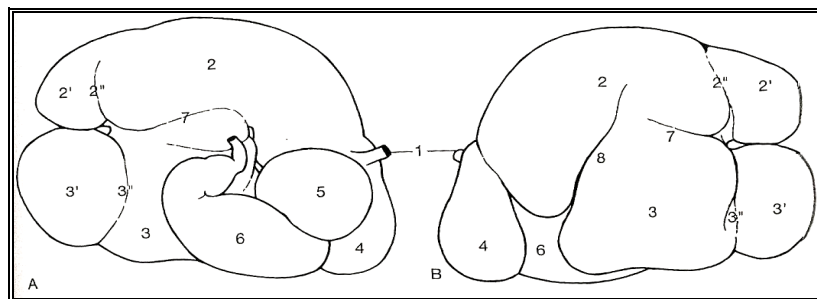


Figura 19: complesso stomacale di bovino: A) veduta laterale destra; B) veduta laterale sinistra; 1) porzione terminale dell'esofago; 2) sacco dorsale del rumine con 2') vescica dello Chabert dorsale e 2'') solco coronario dorsale; 3) sacco ventrale del rumine con 3') vescica dello Chabert ventrale e 3'') solco coronario ventrale; 4) reticolo; 5) omaso; 6) abomaso; 7) solco longitudinale; 8) solco craniale.

Il *rumine* è l'organo più grande del complesso stomacale e occupa da solo tutta la metà sinistra della cavità addominale e parte della destra (nel bovino adulto ha una capacità di 100-200 L). Un grosso solco longitudinale separa un sacco dorsale, più grande, da un sacco ventrale; un secondo solco, perpendicolare al primo, consente di individuare due fondi ciechi caudali, o vescicole coniche o dello Chabert; tutti i sacchi sono all'interno ampiamente comunicanti tra loro.

In prossimità del cardias (sfintere terminale dell'esofago), il sacco dorsale continua con il *reticolo*, il prestomaco più piccolo, appoggiato al fegato e al diaframma.

Il terzo prestomaco, l'*omaso*, è addossato alla superficie mediale del rumine aderente al fegato.

L'*abomaso* è un vero e proprio *stomaco ghiandolare* e corrisponde in forma e struttura allo stomaco dei monogastrici. È posto subito dietro l'omaso e comunica con l'intestino tramite una valvola pilorica o piloro. La sua parte secernente è divisibile in due regioni: quella delle ghiandole proprie e quella delle piloriche. Queste ultime secernono mucine protettive e succo gastrico (ricco di H^+ , Cl^- e di enzimi quali la pepsina e la chimasi gastrica) per la digestione della proteine.

Forma e dimensione dei vari organi del complesso stomacale variano nel corso della vita del singolo animale e differiscono tra le specie. Alla nascita il più sviluppato è l'abomaso, essendo l'unico organo funzionante durante il periodo di alimentazione latte. In seguito i prestomaci si accrescono maggiormente dell'abomaso fino a raggiungere le dimensioni definitive: alla maturità in un bovino l'80 % del volume dell'intero complesso stomacale è rappresentato dal rumine, il 5 % dal reticolo, il 7-8 % dall'omaso e l'8-7 % dall'abomaso. I ruminanti caratterizzati da un'alimentazione prevalentemente arbustiva o arborea (capra, daino, cervo, capriolo, alce, giraffa) hanno un rumine leggermente meno sviluppato.

1.5.2 PROCESSO DIGESTIVO

Per i ruminanti da un terzo a un quarto della giornata (6-8 ore) è destinato all'alimentazione, con un numero di pasti che, in condizioni di libertà, può variare da 2-3 a 7-8 a seconda delle specie. I pasti sono più numerosi negli animali prevalentemente *brucatori* (come l'alce e il capriolo), caratterizzati da un apparato stomacale più piccolo, i quali selezionando le parti più proteiche, meno fibrose e più digeribili del cibo, prediligono le erbe tenere, i giovani germogli e le foglie di alcuni alberi; i pasti sono meno numerosi e di conseguenza più abbondanti negli animali prevalentemente *pascolatori*, come bovini e ovini, forniti di un grande rumine e che normalmente si nutrono di foraggi grossolani. Animali quali il cervo, il daino, la capra e il cammello riescono, invece, ad adattarsi sia alla brucatura che al pascolo, spesso con il variare delle stagioni.

Le modalità di assunzione del cibo variano molto a seconda delle specie. I grossi mammiferi utilizzano solo la bocca: mentre i bovini usano nella prensione prevalentemente la lingua e i denti incisivi, gli ovini, i caprini, gli equini, i suini e i cammelli soprattutto le labbra.

Nei *monogastrici* il bolo alimentare, ovvero il cibo masticato e insalivato, passa nello stomaco unico in cui le ghiandole parietali secernono il succo gastrico, liquido fortemente acido (pH 1-2) per la presenza di acido cloridrico, e contenente l'enzima proteolitico pepsina e la chimasi gastrica o

caglio, responsabile della coagulazione del latte; in alcune specie sono presenti anche enzimi lipolitici.

Nei *ruminanti* la digestione gastrica è preceduta da una serie di trattamenti chimico-fisici a livello prestomacale. I processi che interessano questi organi sono la fermentazione microbica, la ruminazione e i movimenti prestomacali, tutti strettamente interdipendenti e in parte contemporanei. In figura 20 è illustrato il percorso di una ipotetica particella alimentare nel complesso stomacale.

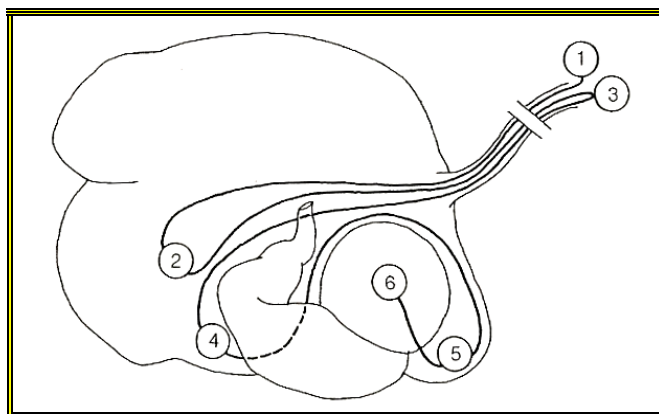


Figura 20: schema del percorso degli alimenti nei ruminanti:
1) prima masticazione; 2) primo stazionamento nel rumine;
3) seconda masticazione (merica); 4) secondo stazionamento nel rumine; 5) passaggio nel reticolo; 6) passaggio nell'omaso.

Fermentazione microbica. Il cibo, masticato grossolanamente (*prima masticazione*), giunge nel rumine (*primo stazionamento*) dove permane per un tempo variabile da alcune ore a qualche giorno. In questo prestomaco, considerato un sacco di deposito e di fermentazione, vivono in simbiosi una ricchissima flora batterica e un'ampia fauna protozoaria capaci di demolire più o meno completamente tutte le sostanze alimentari. Importante è la presenza di microrganismi cellulolitici, i quali possiedono le cellulasi, enzimi in grado di digerire la cellulosa riducendola prima a glucidi più semplici e poi ad acidi grassi volatili (AGV, principalmente acido acetico, acido propionico e acido butirrico); essi, attraversate le mucose prestomacali, passano nel circolo sanguigno e vengono utilizzati sia per scopi plastici che energetici. L'acido acetico, ad esempio, può entrare nel metabolismo terminale delle cellule dell'animale e fornire energia, oppure, può condensarsi con altri acidi e dare origine ad acidi grassi a catena lunga e quindi ai grassi di deposito e, nelle femmine, al grasso del latte; l'acido propionico, giunto nel fegato, può essere convertito in

glucosio e diventare così una fonte energetica. I microrganismi ruminali sono in grado di digerire anche l'amido, dal quale, analogamente alla cellulosa, si originano AGV in proporzioni relative, tuttavia un po' diverse dai monogastrici, con maggiori percentuali di propionico e minori di acetico (tabella 14).

Tabella 14: percentuali dei principali acidi grassi volatili prodotti nel rumine con dieta prevalentemente cellulosica e con dieta prevalentemente amilacea.

	Acetico	Propionico	Butirrico
Dieta cellulosica	70	15	10
Dieta amilacea	50	30	15

I batteri sono anche in grado di digerire alcune proteine vegetali liberando da queste amminoacidi e ammoniaca che, assorbita direttamente a livello ruminale, viene trasportata in sede epatica dove dà origine ad urea. Questa, reimmessa nel sangue, in parte viene eliminata per via urinaria e in parte rientra nel rumine attraverso la saliva. I batteri e molti protozoi hanno la capacità di sintetizzare, a partire dal materiale alimentare e dall'urea, amminoacidi diversi da quelli introdotti nel rumine con la dieta.

Un ultimo aspetto della digestione ruminale riguarda i grassi, i quali sono in parte idrolizzati dai batteri a glicerina e acidi grassi; gli acidi grassi insaturi vengono poi, per la maggior parte, saturati dagli stessi batteri rappresentando perciò un sistema tampone fondamentale per quest'organo.

Ruminazione. Si definisce tale quel processo caratteristico dei ruminanti per cui il cibo, precedentemente ingerito, viene riportato alla bocca per subire una seconda più prolungata masticazione, chiamata *masticazione mericica*. Dopo 30-60 min dalla fine del pasto, le sostanze più grossolane presenti nel rumine, che galleggiano sulla parte più digerita e sminuzzata, stimolano recettori nervosi presenti al livello della doccia esofagea che determinano nell'animale l'impulso a riportare il cibo alla bocca. Non appena il bolo è giunto alla bocca, l'animale deglutisce un paio di volte per eliminare gli eccessi di liquido, quindi rimastica lentamente e a lungo (circa un minuto) prima di deglutire e d'iniziare un nuovo ciclo.

Movimenti prestomacali. Il cibo deglutito trova nel rumine altro cibo ingerito precedentemente, già parzialmente imbibito, sminuzzato e digerito dall'attività fermentativa e, avendo un peso specifico minore, si stratifica su di esso. Sopra il contenuto semifluido sono presenti gas di fermentazione, anidride carbonica e metano, periodicamente espulsi mediante l'eruttazione. La stessa stratificazione si realizza nel *reticolo*, ampiamente comunicante col primo prestomaco.

La situazione viene tuttavia continuamente modificata dai movimenti prestomacali che si succedono secondo cicli della durata di circa un minuto. In ogni ciclo il reticolo funge da vera e propria valvola di distribuzione: si riempie, consente la stratificazione dei materiali sulla base del peso specifico, attraverso una prima contrazione reticolare invia nel rumine le porzioni più superficiali, che essendo meno digerite necessitano di ulteriore imbibizione, di altre fermentazioni microbiche ed eventualmente di nuove masticazioni mericiche, e attraverso una seconda contrazione reticolare fa passare nell'*omaso* le porzioni più digerite, a maggior peso specifico. Il reticolo, rimasto vuoto, viene nuovamente riempito mediante contrazioni delle pareti ruminali, le prime delle quali hanno anche il compito di rimescolare profondamente tutto il contenuto dell'organo e le ultime di espellere i gas di fermentazione.

Perché il succo gastrico nell'*abomaso* non sia eccessivamente diluito, compromettendo la digestione, nell'*omaso* avviene l'assorbimento di una certa quantità di acqua dal contenuto prestomacale, favorito dal grande sviluppo superficiale che la mucosa dell'organo presenta grazie alle numerose lamine. Prosegue, inoltre, la demolizione fisica delle particelle alimentari e continuano gli attacchi microbici sulle particelle alimentari via via più sminuzzate.

In condizioni normali, i movimenti prestomacali non si arrestano mai dal momento che il rumine per svuotarsi completamente impiegherebbe diversi giorni e nel frattempo l'animale continua ad alimentarsi.

Alla fine la poltiglia alimentare, assieme a batteri protozoi ad essa aderenti, passa nell'*abomaso* dove si ha una *digestione gastrica* del tutto analoga a quella che si realizza nello stomaco unico dei monogastrici. I microrganismi ruminanti ancora in vita, giunti nell'*abomaso*, vengono rapidamente uccisi dal repentino cambiamento del pH, data la presenza e la continua produzione di acido cloridrico, e digeriti insieme alle spoglie dei microrganismi già morti e ai residui alimentari.

Contrariamente a quanto si verifica nei monogastrici, ciò che giunge nell'*abomaso* ha una composizione piuttosto diversa dall'alimento ingerito dall'animale. Nei ruminanti, infatti, una certa quantità di polisaccaridi non arriva nell'*abomaso* perché già trasformata in acidi grassi volatili, una

parte generalmente modesta delle sostanze azotate è trasformata in ammoniaca e anidride carbonica, mentre una parte più o meno consistente viene convertita in proteina batterica e protozoaria. Inoltre a causa della capacità bioidrogenante di molti microrganismi ruminanti la maggior parte degli acidi grassi insaturi viene saturata (figura 21).

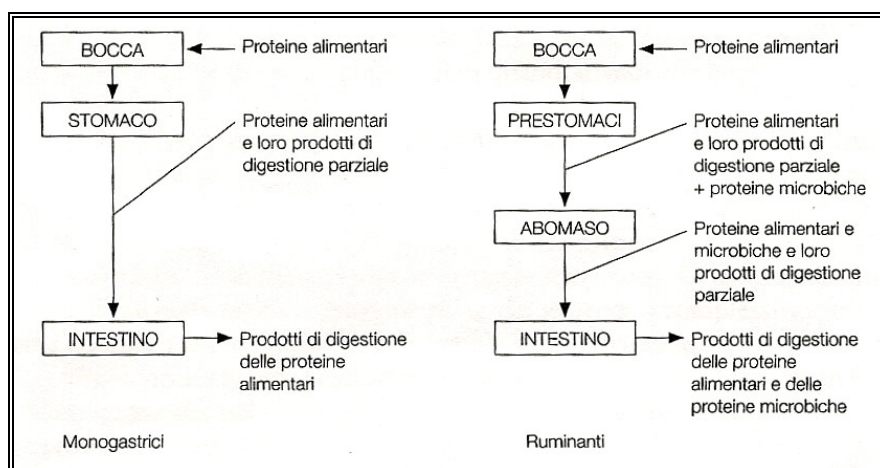


Figura 21: schema digestivo delle proteine nei monogastrici e nei ruminanti.

1.6 STATO DELL'ARTE

1.6.1 VITAMINE LIPOSOLUBILI E CAROTENOIDI

a. Procedure estrattive per alimenti di origine animale

La frazione lipidica degli alimenti di origine animale, contenente le vitamine liposolubili e i carotenoidi, è composta principalmente da trigliceridi, con piccole quantità di steroli, fosfolipidi, e costituenti lipidici minori. Tutte queste sostanze rappresentano una possibile fonte di interferenza, esibendo una solubilità analoga a quella delle vitamine liposolubili e dei carotenoidi.

Le procedure estrattive presenti in letteratura prevedono: estrazione diretta con solventi [49, 50, 51, 52, 53] saponificazione a caldo [2, 4, 5, 6, 49, 54, 55, 56] o a temperatura ambiente [7, 52], idrolisi enzimatica [2, 57, 58, 59, 60], clean-up su cartuccia SPE [7, 52] ed estrazione SFE [59]. La saponificazione seguita da estrazione con solventi è quindi la procedura di trattamento del campione maggiormente utilizzata per la determinazione delle vitamine liposolubili nel latte. Essa distrugge

gli agglomerati lipidici facilitando l'estrazione grazie al rilascio di caroteni, retinoidi, tocoferoli e vitameri D dalla matrice alimentare, mentre xantofille e vitameri K sono degradati rapidamente in ambiente alcalino a caldo. Per estrarre la vitamina K, dunque, si ricorre spesso a estrazione diretta con solvente o digestione enzimatica con lipasi [47, 61]. Fattori sottoposti ad ottimizzazione sono: dimensioni del campione, concentrazione di potassa, temperatura e tempi della digestione alcalina, composizione della soluzione saponificata prima dell'estrazione e solventi di estrazione. Anche la scelta dell'antiossidante e la rimozione dell'ossigeno con azoto sono parametri importanti. Spesso per determinare la frazione vitaminica liposolubile nelle matrici alimentari viene realizzata un'estrazione "su grande-scala" (grandi quantità di campione), specialmente nel caso di componenti presenti in piccola quantità (vitameri D nel latte).

b. Metodi cromatografici

I metodi per l'analisi dei carotenoidi e delle vitamine liposolubili sono principalmente basati su tecniche di cromatografia liquida (LC) [62].

Per l'analisi della **vitamina A** si ricorre principalmente alla cromatografia a fase inversa su colonne C_{18} [63] (fase mobile metanolo-acqua, 99:1 v/v). Il sistema di rivelazione più usato è il detector UV a lunghezza d'onda selezionata (325 nm); il DAD (*Diode Array Detector*) è utile per distinguere, sulla base degli spettri di assorbimento, i vari isomeri *cis-trans*, se presenti, mentre il rivelatore a fluorescenza (ex 350/em 470 nm) risulta meno sensibile alle interferenze da parte di altri composti liposolubili.

Per la determinazione della **vitamina D** totale sono state usate sia la cromatografia a fase diretta (fase amminica legata) che la cromatografia a fase inversa; quest'ultima tecnica cromatografica è anche in grado di risolvere efficientemente e quantificare separatamente i due vitameri D2 e D3 [64]. La rivelazione può essere condotta con il detector UV a lunghezza d'onda fissa (254 nm) o multipla (a 260 [65] e a 301 nm [66]).

Per l'analisi dei **vitameri E** (tocoferoli e tocotrienoli) è possibile impiegare sia la cromatografia a fase normale (silice e fase amminica legata), che riesce a separare tutti e otto gli omologhi, che la cromatografia a fase inversa (C_{18}) [67]. La rivelazione UV (210, 215, 280, 288 nm [68, 69]) è almeno 10 volte meno sensibile della fluorescenza (ex 290/em 330 nm) [70, 71, 72] e necessita di un'accurata scelta della fase mobile.

Scarse sono le applicazioni della cromatografia a fase normale per la determinazione della **vitamina K**, mentre numerose quelle relative alla cromatografia a fase inversa (C_{18}). I rivelatori più utilizzati sono l'UV (248, 251 nm), il rivelatore elettrochimico (elettrodo di Ag vs elettrodo al calomelano) e il fluorimetro (ex 320 nm/em 430 nm); questi ultimi due rivelatori sono utilizzati a seguito di una reazione di riduzione elettrochimica [73]

La maggior parte delle separazioni di **carotenoidi** riportate in letteratura fa uso della cromatografia liquida a fase inversa. Le colonne più utilizzate sono le analitiche C_{18} (250 x 4.6 mm e particelle con diametro di 5 μm) con diverse composizioni di fase mobile e diverse modalità di eluizione (isocratica, in gradiente lineare e non). Nel confronto fra colonne C_{18} monomeriche e polimeriche, usando fasi mobili a base di metanolo, è stata verificata una migliore selettività per le polimeriche ed il sistema solvente più appropriato è risultato metanolo-tetraidrofurano (90:10, v/v). Le colonne C_{18} polimeriche risultano leggermente più efficienti nella difficile separazione di luteina e zeaxantina (isomeri strutturali) e nella separazione degli isomeri *cis-trans* di uno specifico carotenoide. Comunque, una risoluzione decisamente superiore è offerta da una fase stazionaria polimerica C_{30} [61] usando metanolo-metilterbutil etere come fase mobile. Per ottenere una migliore separazione delle xantofille su una colonna C_{18} , è stato verificato che l'uso di una fase mobile contenente una percentuale di acqua consente di migliorare notevolmente la risoluzione e di rilevare un numero più elevato di questi composti negli alimenti analizzati.

I sistemi di rivelazione DAD si sono rivelati i più adatti in quanto sono in grado di registrare l'intero range spettrale (da 200 a 800 nm) durante l'analisi cromatografica. In questo modo è possibile estrapolare qualsiasi cromatogramma ad una specifica lunghezza d'onda oppure avere lo spettro di assorbimento corrispondente a ciascun picco cromatografico. Il range di lunghezza d'onda selezionato dipende dallo scopo del lavoro: se si vogliono seguire soltanto i carotenoidi normalmente si usa il range 350-550 nm, ma se si vogliono determinare simultaneamente anche vitamine liposolubili, come la vitamina A e i tocoferoli, si usa un range compreso tra 250 e 550 nm. Molti lavori sono condotti ad una lunghezza d'onda fissa pari a 450 nm.

Un altro tipo di detector impiegato per l'analisi cromatografica dei carotenoidi è il rivelatore elettrochimico che si è dimostrato non solo 100-1000 volte più sensibile dei convenzionali rivelatori spettrofotometrici ma anche estremamente selettivo, fornendo dei segnali caratteristici per ciascun carotenoide e per gli isomeri *cis-trans* del β -carotene.

c. Metodi cromatografici (LC-DAD, LC-MS) per la determinazione simultanea di vitamine liposolubili e carotenoidi nel latte

La determinazione simultanea delle vitamine liposolubili [74] è stata realizzata estesamente in campioni di plasma e siero: α -tocoferolo, retinoidi e carotenoidi possono essere quantificati in questo tipo di matrici tramite cromatografia a fase inversa, utilizzando la rivelazione UV per carotenoidi e retinoidi e la fluorescenza per i tocoferoli. Lo stesso può essere affermato anche per quel che riguarda la ricerca in matrici alimentari quali frutta, verdura, etc.; pochi studi sono invece stati pubblicati circa l'analisi di questi composti nel latte bovino.

La saponificazione a caldo è la procedura più usata per il recupero simultaneo di retinolo, tocoferoli e colecalciferolo. A causa della temperatura, l'isomerizzazione termica della vitamina D può causare una perdita di circa il 20%. Una procedura alternativa per rimuovere i trigliceridi, senza causare degradazione della vitamina K, è l'idrolisi enzimatica con lipasi che è stata applicata anche per il recupero simultaneo delle vitamine A, D, E e K dal latte fortificato [75].

La maggior parte degli studi presenti in letteratura viene condotta con sistemi di rivelazione classici: spettrofotometria di assorbimento UV-vis [5, 6, 50, 52], UV-DAD [49, 51, 55], spettrofotometria in fluorescenza [53, 58, 60], metodi elettrochimici [7] sia soli che in combinazione con la rivelazione UV-vis o DAD [4, 10, 56, 59]. In diversi casi l'attenzione è rivolta alla determinazione del contenuto vitaminico nei tipi di latte fortificati o preparati destinati all'infanzia, dove le elevate quantità presenti permettono di superare le difficoltà analitiche relative alla quantificazione delle forme endogene presenti solo in tracce (vitameri D). La tabella 15 descrive schematicamente i metodi analitici con rivelazione UV-vis, DAD, a fluorescenza ed elettrochimica, impiegati per l'analisi di vitamine liposolubili e carotenoidi nel latte bovino ed alcuni suoi derivati.

In letteratura non sono rintracciabili lavori scientifici in cui vengano descritti metodi HPLC-MS per la determinazione simultanea di vitamine liposolubili e carotenoidi nel latte di mucca, bufala, capra, pecora e asina. Solo due articoli riportano la determinazione delle vitamine A, D, E in formulati per l'infanzia [7] e nel latte umano [2].

Heudi et al. [57] estraevano le vitamine A, D, E mediante idrolisi enzimatica con takadiastase ($T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 30 min), seguita da idrolisi alcalina (KOH in etanolo a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 30 min) e successiva estrazione SPE. L'estratto organico (esano) era iniettato nel sistema LC-APCI(+)-MS in modalità SIM.

Lo studio condotto sul latte umano da Kamao et al. [2] per la determinazione delle vitamine liposolubili con strumentazione HPLC-APCI (+)-tandem MS in modalità MRM, propone l'utilizzo di due diverse procedure estrattive: una basata sulla saponificazione alcalina (KOH al 60% (w/v) a 70°C per 60 min) seguita da estrazione con esano-etilacetato (9:1 v/v) per la vitamina A (retinolo), E (α -tocoferolo) e D (D2, D3, 25(OH)D2, 25(OH)D3); l'altra basata su digestione enzimatica con lipasi (in tampone fosfato a pH 7.7 a 37°C per 90 min) seguita da estrazione con esano e clean-up SPE su cartucce Sep-Pak Vac silica per la vitamina K (K1, MK-4, MK-7), suscettibile all'ambiente basico. Nonostante, la simultanea estrazione con le vitamine A ed E, gli omologhi D erano analizzati separatamente dopo derivatizzazione con un reagente Cookson-type.

1.6.2 RETINOIDI

a. metodi analitici

La maggior parte degli studi presenti in letteratura riguarda la determinazione di retinolo e retinil esteri in matrici biologiche quali siero, plasma e tessuti di uomo o animali (soprattutto ratti e topi), cui talvolta è stata preventivamente somministrata vitamina A sotto forma di retinil palmitato. Le pubblicazioni su siero e plasma [76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87] hanno come fine lo studio del metabolismo a scopo clinico, poichè è stato infatti dimostrato [82] che l'esistenza di ipervitaminosi A nell'uomo può essere caratterizzata da un incremento della concentrazione di retinil esteri nel siero, anche in condizioni in cui le concentrazioni di retinolo sono normali. A tal fine, alcuni studi [77, 80], per poter determinare in maniera più rapida la frazione di vitamina A libera (retinolo) e quella legata agli acidi grassi (esteri totali), hanno messo a punto una separazione cromatografica di breve durata in cui i retinil esteri coeluiscono in un unico picco separato da quello del retinolo libero.

I lavori condotti sui tessuti biologici [78, 79, 80, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93] sono importanti per lo studio dell'omeostasi della vitamina A, ultimamente collegata con alcune malattie quali diabete, obesità, cancro e Alzheimer. La matrice più analizzata è il fegato, principale sito di stoccaggio di questa vitamina, ma ultimamente sta aumentando l'attenzione sul ruolo chemio-preventivo dei retinoidi nello sviluppo del cancro nei tessuti epiteliali [94].

Tutti i lavori condotti su matrici biologiche sono concordi nell'affermare che i retinil esteri predominanti sono quelli con acidi grassi a lunga catena quali acido palmitico, oleico, linoleico e stearico.

I primi metodi di analisi chimica dei retinoidi risalgono a prima dello sviluppo dell'HPLC; studi degli anni 60' hanno utilizzato la cromatografia su strato sottile (TLC, thin layer chromatography) [95] o la gascromatografia di ripartizione (GLC, gas-liquid chromatography) [96] per la separazione e la quantificazione dei retinil esteri. Tramite TLC gli analiti erano dapprima separati su lastrina impregnata d'argento, secondo il loro grado d'insaturazione, e successivamente su lastrina a fase inversa, in base alla lunghezza della catena dell'acido grasso. La procedura analitica con la GLC consisteva nella saponificazione degli esteri seguita dalla conversione in metil esteri e cromatografia su colonna con fase stazionaria polare.

In seguito, la tecnica più utilizzata è stata la cromatografia liquida, particolarmente adatta per l'analisi di analiti termolabili. L'HPLC a fase normale è stata usata soprattutto per la separazione degli isomeri geometrici dei retinoidi (retinolo, retinil esteri, retinale, acido retinoico) caratterizzati da un differente grado di attività biologica, con gel di silice come fase stazionaria e fasi mobili composte da miscele esano/diossano o 2-propanolo/esano [80, 97].

Generalmente, la separazione HPLC dei vari retinil esteri è stata realizzata tramite cromatografia a fase inversa su colonne C_{18} [8, 76, 78, 79, 81, 82, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93], con diverse composizioni di fase mobile e modalità di eluizione (isocratica, in gradiente lineare e non). Soltanto un lavoro [85] ha riportato la separazione di retinolo, retinil palmitato, retinil stearato e α -tocoferolo su colonna monolitica C_{18} . Un numero ridotto di studi ha proposto separazioni con cromatografia a fase inversa su colonne con differente fase stazionaria come C_8 [83, 98, 99] e C_{30} [84] separando comunque un numero limitato di analiti.

In generale, in cromatografia a fase inversa la separazione dei retinil esteri avviene sulla base della lunghezza della catena dell'acido grasso e del grado di insaturazione. Proprio per questo, vista la somiglianza strutturale di alcuni acidi grassi, in alcune pubblicazioni che utilizzano C_{18} come fase stazionaria [79, 82, 89] rimangono irrisolti problemi di coeluizione o di non completa separazione. Le coppie che più spesso presentano tali problemi sono retinil palmitato ($C_{16:0}$)/oleato ($C_{18:1}$), retinil miristato ($C_{14:0}$)/linoleato ($C_{18:2}$), retinil laurato ($C_{12:0}$)/arachidonato ($C_{20:4}$), retinil miristato ($C_{14:0}$)/palmitoleato ($C_{16:1}$); la separazione di oleato e palmitato può essere difficile dal momento che, mentre i due atomi di carbonio in più del retinil oleato gli conferiscono un

decremento di polarità, il doppio legame ha l'effetto opposto e un discorso analogo può essere fatto per le altre coppie di retinil esteri.

De Ruyter e Leenheer [81] aggiungendo nitrato d'argento alla fase mobile ottenevano la separazione del retinil oleato dal palmitato a seguito della complessazione dei doppi legami con gli ioni argento: lavorando con una colonna C₁₈, in modalità di eluizione isocratica con metanolo, diminuiva il tempo di ritenzione dei retinil esteri con insaturazioni migliorando la selettività α .

L'elettroforesi capillare è stata l'ultima tecnica proposta, circa dieci anni fa, per la determinazione dei retinil esteri: Line Roed et al. hanno utilizzato come fase stazionaria sia una C₁₈ [90] che una C₃₀ [100].

Il sistema di rivelazione più utilizzato per la determinazione dei retinoidi e dei loro isomeri geometrici è il rivelatore UV-vis, dal momento che questi composti sono caratterizzati da un forte assorbimento UV in virtù del loro sistema coniugato di doppi legami [8, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 85, 86, 88, 90, 97, 99, 100]. La lunghezza d'onda generalmente scelta per la rivelazione di retinolo e retinil esteri è 325 nm. In alcuni studi [87, 89, 92, 98] il rivelatore DAD (diode array detector), consentendo la registrazione dello spettro di assorbimento, si è dimostrato un utile strumento per l'identificazione dei retinoidi.

Orth et al. [90] hanno dimostrato che l'uso del rivelatore a fluorescenza ($\lambda_{\text{ex}}=330 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}}=490 \text{ nm}$) per la vitamina A, rispetto a quello UV, risulta più selettivo, dal momento che risente meno dell'interferenza da parte di altri composti liposolubili come ad esempio licopene e β -carotene.

La difficile separazione cromatografica e la somiglianza dello spettro di assorbimento possono rendere complessa l'identificazione dei retinil esteri; queste problematiche sono state superate con l'introduzione della spettrometria di massa come sistema di rivelazione. Nel lavoro di Van Breemen et. al [101], pubblicato nel 1996 e realizzato soltanto in solvente, per la prima volta è stato utilizzato l'accoppiamento HPLC-ESI-MS a singolo quadrupolo per la determinazione di acido retinoico, retinolo, retinale e retinil acetato. Sempre Van Breemen [84], nel 1998, ha riportato la determinazione di retinolo e retinil palmitato nel siero umano mediante HPLC-APCI-MS a singolo quadrupolo.

Una pubblicazione del 1997 [91] ha sviluppato un metodo per l'analisi di retinolo e quindici suoi esteri nel fegato di topo mediante HPLC-LDI (laser desorption ionization)-TOF, mentre più recentemente un altro studio [93] ha riportato la determinazione di acido retinoico, retinolo e sei

retinil esteri nel polmone di topo mediante HPLC-DAD+PSD-LDI (postsorce decay-laser desorption/ionization)-MS.

b. metodi analitici per la determinazione dei vitameri A nel latte

Il numero di pubblicazioni inerenti l'analisi quali-quantitativa dei diversi vitameri della vitamina A nel latte è limitato rispetto a quello delle matrici biologiche. Come già visto nel paragrafo 1.3.2, una sola pubblicazione [8] descrive lo studio, realizzato tramite HPLC-UV ($\lambda = 325 \text{ nm}$), del profilo dei retinoidi nel latte umano e di alcune specie animali (mucca, capra, ratto). In tale lavoro (tabella 16), il retinolo e tredici suoi esteri con acidi grassi erano estratti mediante estrazione diretta con esano dalla frazione lipidica del latte precedentemente isolata e privata del contenuto proteico. Nonostante l'uso di un sistema tandem di colonne cromatografiche C_{18} , l'autore riportava la coeluizione delle due coppie retinil laurato/arachidonato e retinil miristato/palmitoleato; inoltre, la complessità della matrice analizzata e la scarsa selettività del sistema di rivelazione utilizzato portavano ad un'identificazione dei vari retinil esteri basata esclusivamente sul loro tempo di ritenzione cromatografico; infine, non sono specificati i recuperi e i limiti del metodo per i vari tipi di latte analizzati.

In precedenza, soltanto lo studio di Catharine Ross del 1986 [99] aveva proposto un metodo analitico, HPLC-UV ($\lambda = 324\text{-}326 \text{ nm}$), per determinare i retinil esteri nel latte umano oltre che in matrici biologiche di ratto. L'estrazione dal latte umano era realizzata con esano, seguiva poi un clean-up su cartuccia di ossido di alluminio disattivato al fine di rimuovere i carotenoidi. La cromatografia, a fase inversa, era condotta su colonna analitica C_8 mediante gradiente con acetonitrile-acqua; erano così separati ed identificati undici esteri del retinolo (retinil caprilato, caprato, laurato, linolenato, miristato, palmitoleato, linoleato, palmitato, oleato, elaidinato, stearato). Tale studio manca della definizione dei limiti del metodo e dell'analisi quantitativa.

Diversi lavori sul latte presenti in letteratura [4, 5, 6] suggeriscono, invece, l'espedito dell'idrolisi alcalina (saponificazione) seguita da estrazione con solvente organico, al fine di semplificare l'analisi della vitamina A dal momento che tutti gli esteri sono convertiti in retinolo, unica forma ad essere quantificata. Sebbene questa metodica non consenta la determinazione delle diverse forme della vitamina A, caratterizzate da un differente grado di attività biologica, consente di evitare una serie di problemi analitici quali la difficoltà di approvvigionamento degli standards, il loro costo e la complessità della messa a punto della separazione cromatografica per via dell'elevato numero di

analiti e della somiglianza strutturale di alcuni. L'alcolisi, essendo un processo più blando della saponificazione, non può essere utilizzata per tale scopo poiché non idrolizza gli esteri della vitamina A, mentre è stato verificato nel latte fortificato [75] che l'idrolisi enzimatica con lipasi converte solo parzialmente retinil palmitato e retinil acetato in retinolo. La saponificazione è generalmente condotta con potassa alcolica (in presenza di acido ascorbico o pirogallolo come antiossidante), la cui quantità richiesta viene calcolata tenendo conto che 3 moli di KOH sono necessarie per ogni mole di grasso (preso come trigliceride). Il retinolo liberato è estratto con solventi come dietil etere, esano, etil acetato o loro miscele. Gli estratti riuniti sono lavati con acqua per eliminare gli alcali residui fino a quando non è più osservabile colorazione per addizione di fenolftaleina e, infine, iniettati nel sistema HPLC-UV ($\lambda=325\text{ nm}$). Soltanto il lavoro di Kamao et al. [9] sul latte umano, condotto sempre mediante idrolisi alcalina, prevede l'utilizzo del sistema HPLC-APCI(+)-MS². Delgado-Zamarreno et al. [7] hanno sviluppato un sistema on-line per la determinazione di retinolo, α -tocoferolo e vitamina D₃ in campioni di latte e di latte in polvere, grazie ad un trattamento automatizzato del campione accoppiato alla separazione cromatografica. Dopo l'idrolisi alcalina e successiva neutralizzazione, i campioni vengono sottoposti a clean-up SPE su cartucce C₁₈; le vitamine vengono poi eluite con metanolo e l'eluato automaticamente iniettato nel sistema cromatografico, cui segue una rivelazione elettrochimica di tipo amperometrico. La saponificazione preclude la definizione delle forme effettivamente presenti nel latte. Soltanto alcuni studi presenti in letteratura [12, 49, 50, 52, 102] propongono metodi multi-vitaminici sul latte che determinano il quantitativo di retinolo e di retinil palmitato, ritenuto il retinil estere prevalente nel latte vaccino, mediante estrazione diretta con solvente e utilizzo del sistema LC-UV ($\lambda=325\text{ nm}$); l'estrazione diretta, oltre ad essere più veloce dell'idrolisi alcalina, è necessaria per conservare le forme legate del retinolo; generalmente viene condotta addizionando al latte etanolo, al fine di denaturare le proteine e fratturare i globuli di grasso, ed esano come solvente estraente. Dopo centrifugazione, la fase superiore di esano contiene la frazione lipidica del latte ed i vitameri A, mentre la fase inferiore etanolo-acqua, sali, proteine denaturate e lipidi polari; l'interfaccia contiene una miscela delle due fasi più le proteine insolubili.

Altri studi multivitaminici, in cui si determinano retinolo e retinil palmitato in latte in polvere e preparati per l'infanzia, sono quello di Rodas Mendoza et al. [51] basato sull'estrazione diretta con esano e quello di Turner et al. [59] realizzato sempre mediante HPLC-UV, nel quale viene proposta l'estrazione con fluido supercritico come metodo alternativo.

Tabella 15: metodi analitici con rivelazione UV-vis, DAD, a fluorescenza ed elettrochimica, impiegati per l'analisi di vitamine liposolubili e carotenoidi nel latte bovino ed alcuni suoi derivati.

Analiti	Matrice	Strumentazione	Condizioni separative	Procedura di estrazione	Prestazioni del metodo		Autori, Anno [Riferimento]
					Recupero (%)	Limiti del metodo e contenuto vitaminico*	
Retinolo, α -tocoferolo e vitamina D ₃ .	Latte, latte in polvere	LC con rivelazione elettrochimica.	Precolumn RP18 15x32mm, 7 μ m, Column OD-224 RP18 220x4.6mm, 5 μ m. Eluizione isocratica con metanolo:acqua (99:1, v/v) acido acetico-acetato di sodio 2.5 mM. Flusso 1mL/min	Sistema automatizzato on-line. Campioni (2g, latte diluito al 30%). Idrolisi alcalina con etanolo e idrossido di sodio in presenza di acido ascorbico Neutralizzazione e preconcentrazione su cartuccia C ₁₈ . Eluizione con metanolo.	88-105%	LOD: 3.49x10 ⁻⁸ mol/L per retinolo, 1.77x10 ⁻⁶ mol/L per D ₃ e 3.11x10 ⁻⁷ mol/L per α -tocoferolo Risultati: retinolo 32-81 μ g/100mL α -tocoferolo 68-193 μ g/100mL vitamina D ₃ assente	Delgado- Zamarreño et al., (1995) [7]
Retinil acetato, retinil palmitato, α -tocoferolo, α -tocoferil acetato, β -carotene	Latte intero (standard o UHT), burro, grasso di latte anidro, latte in polvere, crema di latte	HPLC-UV/Vis, fluorescenza I.S. idrossianisolo-3- tert-butilato	Econosphere silica column (3 μ m, 150 x 4.6 mm). Eluizione isocratica con esano/ diisopropil etero (97:3) allo 0.04% in acido acetico. Flusso di 1.5 mL/min	Per burro e grasso anidro semplice dissoluzione in esano, seguita da centrifugazione ed iniezione frazione supernatante. Per latte, latte in polvere e infant formula, estrazione dei grassi secondo la procedura di Rose-Gottlieb modificata.	Solo per latte intero in polvere: 97% retinil palmitato 94% α -tocoferolo 99% β -carotene	LOD: non riportati. Risultati latte UHT: Vitamina A= 0.4 come μ g di retinolo equivalenti per grammi di prodotto. Vitamina E= 0.6 μ g/g β -carotene assente	Hewavitharanaa et al., (1996)[12]

Fillocchinone, menachinone-4, menachinone-6, menachinone-7, menachinone-9, menachinone-10, 2',3'- diidrofillochinone	Latte di diverse specie animali e infant formula	HPLC-fluorescenza dopo riduzione post-colonna con zinco.	Resolve cartridge column C18 5µm (100x8 mm I.D.). Eluizione isocratica con metanolo/diclorometano (90:10) con aggiunta di ZnCl ₂ , acetato di sodio anidro e acido acetico glaciale ad un flusso di 1.5 mL/min.	Campioni di latte (10g) diluiti a 15 mL sottoposti a digestione enzimatica con lipase T= 37 °C per 120 min, raffreddato, addizionato di 10mL di una miscela di etanolo/metanolo (95:5) e 1g di K ₂ CO ₃ . 30mL di esano per l'estrazione, 5 mL portati a secco, ripresi con 1 mL di metanolo ed iniettati nel sistema HPLC.	98%	LOD: fillocchinone 1.5 ng/mL Risultati latte bovino: fillocchinone=0.54 µg/100g menachinone-4= 0.40 µg/100g	Indyk et al., (1997) [58]
Retinolo, retinil acetato, retinil palmitato, α-tocoferolo, α-tocoferil acetato, ergocalciferolo, colecalfiferolo, ergosterolo, 7-deidrocolesterolo fillocchinone	Latte sterilizzato fortificato	µLC-UV, 325 nm per retinolo, retinil acetato e retinil palmitato. 264 nm per D ₂ e D ₃ 280 nm per K ₁ , α-tocoferolo, tocoferil acetato, ergosterolo e 7-deidrocolesterolo	Colonna Hypersil C ₁₈ BDS (150x0.3 mm I.D., 3 µm). Eluizione in gradiente con metanolo/acqua (99:1) fase A e metanolo/tetraidrofurano (70:30) fase B. Flusso di 0.1 mL/min a temperatura ambiente.	Campioni (5 mL) addizionati con 5 mL di etanolo allo 0.025% in BHT, ultrasuoni 2 min. Estrazione diretta con esano (15 mL) in imbuto separatore per 2 volte. Lavaggio con 5 mL di metanolo/acqua (9:1). Strato organico filtrato ed evaporato a seccchezza, ripreso con 100 µL di metanolo e 60 nL iniettati.	89-107%	LOD (ng/mL) retinolo=0.02 retinil acetato=0.03 retinil palmitato=0.1 ergocalciferolo=2 colecalfiferolo=0.2 α-tocoferolo=2 tocoferil acetato=2 ergosterolo=1 7-deidrocolesterolo=0.4 fillocchinone=0.4	Gomis et al., 2000 [50]
α-tocoferolo, β-tocoferolo, γ-tocoferolo, δ-tocoferolo, β-carotene, colecalfiferolo, retinolo, tocotrienoli	Latte standard e pesce	HPLC-UV/Vis per retinolo, β-carotene e vitameri D - fluorescenza per tocoferoli I.S. ergocalciferolo per colecalfiferolo	µ-Porasil column (10µm, 30 cm x 3.9 mm, Waters) eluizione in gradiente con n-esano fase A, diisopropil etere fase B e diisopropil etere/n- esano (90:10) temperatura a 30°C	Campioni di latte termostatato a 40°C (1g) addizionato con etanolo (4mL). Saponificazione con KOH 50% (m/v) in bagno di acqua bollente per 20 min ed estrazione con n-esano-etil acetato.	α-tocoferolo=91% β-carotene=86% retinolo=82%	LOD:(ng/100g) colecalfiferolo=3 β-carotene=1 α-,β-,γ-,δ-tocoferoli=2 retinolo=2 Risultati (µg/100g): α-tocoferolo=57 β-carotene=13 retinolo=28	Salo- Väänänen et al., (2000) [4]

<p>Retinolo, retinil acetato, retinil palmitato, ergocalciferolo, colecalfiferolo, ergosterolo, 7-deidro-D₃, α-tocoferolo, α-tocoferil acetato fillochinone,</p>	<p>Latte fresco, latte fortificato e burro</p>	<p>HPLC-UV a 325 nm retinolo e retinil esteri 264 nm vitameri D 280 nm vitamina K₁, α-tocoferolo, tocoferil acetato ergosterolo, 7-deidrocolecalfiferolo</p>	<p>Cromatografia a fase inversa su colonna narrow bore Extrasil OSD2, 150 x 2.1mm I.D. alla T=20°C Eluizione in gradiente con metanolo/acqua (99:1) fase A e metanolo/tetraidrofurano (70:30) e con gradiente di flusso (<0.2 mL/min).</p>	<p>1) Campioni (1mL)+ 500μL di etanolo, ultrasuoni per 2 min, diluizione a 4 mL con acqua, quindi SPE su cartucce Mega Bond Elut C₁₈, eluizione con metanolo (6mL), filtrato, a secchezza e ricostituito con 20 μL di etanolo. Oppure 2) 5 mL + 5 mL di etanolo, ultrasuoni per 2 min. Estrazione liquido-liquido con esano (15 mL) per due volte. Estratti combinati portati a secco ripresi con 20 μL di metanolo e iniettati. 3) Idrolisi alcalina: 5 mL saponificati a T ambiente per tutta la notte con KOH 60% (m/v) in acqua + etanolo seguita da estrazione liquido-liquido con esano come in 2).</p>	<p>1) 74-116% 2) 79-105%</p>	<p>LOD (ng iniettati): da 0.14 a 6.9. Risultati dopo applicazione metodo 2): identificati ma non quantificati, retinolo, retinil acetato, ergosterolo, colecalfiferolo, α-tocoferolo, ergosterolo, tocoferil acetato e retinil palmitato</p>	<p>Blanco et al. (2000) [52]</p>
<p>Retinolo retinil palmitato, α-tocoferolo, γ-tocoferolo, δ-tocoferolo α-tocoferil acetato, ergocalciferolo,</p>	<p>Latte in polvere e preparati per l'infanzia</p>	<p>HPLC-UV/Vis - fluorescenza</p>	<p>Eluizione in gradiente con le seguenti fasi mobili A: metanolo and B: isopropil alcol, nelle proporzioni: 0–25 min. A (100%), 25–35 min. A (100%)— A/B (80:20), 35–48 min. A/B (80:20) ed infine 48–60 min. riequilibrio del sistema con A (100%).</p>	<p>Estrazione con fluido supercritico utilizzando <i>Candida antarctica</i> immobilizzata</p>	<p>112%,101% 96%,119%</p>	<p>Non riportato</p>	<p>Turner et al. (2001) [59]</p>

Retinolo, α -tocoferolo ergocalciferolo, colecalfiferolo	Latte, yogurt, latticini e pasti precotti	HPLC-UV 325 nm retinolo e retinil acetato, 265 nm ergocalciferolo e colecalfiferolo 294 nm α -tocoferolo I.S. retinil acetato	Spherisorb ODS-2 C ₁₈ 5 μ m, 250x4.6 mm. Eluizione isocratica con metanolo/acqua (96:4)	Saponificazione su 10 g di campione addizionati con etanolo (40mL) e con KOH (10mL) al 50% (m/v) a T=80°C per 30 min in presenza di acido ascorbico seguita da estrazione con dietil etere (50 mL) per 4 volte.	retinolo=96% α -tocoferolo= 97%	LOD (μ g/100g): retinolo=0.19 α -tocoferolo=8.33 per vitameri D solo identificazione qualitativa. Risultati (μ g/100g): retinolo= latte(29), yogurt(17); α -tocoferolo=latte(94), yogurt(53)	Escrivà et al., (2002) [5]
All- <i>trans</i> - fillochinone, <i>cis</i> -fillochinoni	Latte, latte in polvere preparati per l'infanzia	HPLC-fluorescenza dopo riduzione post-colonna con zinco	YMC C ₃₀ 250x4.6 mm, 3 μ m	Idrolisi enzimatica con lipase a T=37°C per 120 min seguita da estrazione con esano.	Non riportato	Non riportato Risultati (μ g/100g): latte omogeneizzato all- <i>trans</i> =0.3 <i>cis</i> =0	Woollard et al (2002) [60]
Retinolo, retinil acetato, retinil palmitato, α -, γ -, δ -tocoferolo α - tocoferil acetato	Latte in polvere e preparati per l'infanzia	HPLC-DAD	Tracer Spherisorb ODS2 C ₁₈ 250x4.6mm I.D., 5 μ m particle size. Eluizione isocratica con metanolo, flusso 1mL/min, temperatura della colonna 50°C	Estrazione diretta del preparato per l'infanzia con etanolo-esano. Estrazione diretta del latte in polvere con etanolo-esano.	1) 94%-106% 2) 97%-101%	LOD (ng): 0.33-33 LOQ (ng): 0.4-37	Rodas Mendoza et al., (2003) [51]
α -, γ -, δ -tocoferolo β -carotene, luteina, zeaxantina, riboflavina, acidi grassi	Latte pastorizzato da animali alimentati con foraggi diversi	HPLC-fluorescenza per α -, γ -, δ -tocoferolo HPLC-DAD per β -carotene, zeaxantina (455nm) e luteina (448nm)	α -, γ -, δ -tocoferolo: Hypersil SI. Eluizione isocratica con esano/2-propanolo (98:2) flusso 0.6 mL/min. β -carotene, luteina, zeaxantina: Vydac Protein Peptide+Hypersil ODS Eluizione in gradiente di flusso con acetonitrile/metanolo/ diclorometano/trietilammina (85:10:4.5:0.5, v/v/v/v)	α -, γ -, δ -tocoferolo: saponificazione su 2 mL di campione + 2 mL di etanolo + 0.3 mL di KOH a 70°C per 60 min seguita da estrazione con eptano. β -carotene, luteina, zeaxantina: saponificazione su 2 mL di campione+2 mL di etanolo+0.5 mL a 70°C per 60 min seguita da estrazione con eptano/ diclorometano (90:10, v/v).	Non riportati	LOD: Non riportato Risultati (μ g/L): Fieno/Mais: α -tocoferolo=854/375 γ -tocoferolo=31/11 δ -tocoferolo=2/1 β -carotene=697/223 luteina=19/3 zeaxantina=4/1	Havemose 2004 [56]

Retinolo, retinil acetato, retinil palmitato, α -, γ -tocoferolo, α -tocoferil acetato, α -carotene, β -carotene, licopene, luteina, zeaxantina	Latte, yogurt, latticini, latte fortificato margarina fortificata	HPLC-DAD 326 nm per retinoidi 294 nm per tocoferoli 450 nm per carotenoidi I.S. β -criptoxantina	Spheri-5 ODS (5 μ m, 4.6x220 mm). Eluizione isocratica con acetonitrile/cloruro di metilene/metanol (70:20:10, v/v/v) flusso di 1.3 mL/min.	1) 1mL di latte + 1 mL di etanolo, vortex 1 min. Estrazione diretta con esano/cloruro di metilene(5:1) per 2 volte. 2) 1 mL di latte + 0.5 KOH in metanol (40% m/v), vortex, ultrasuoni per 15 min a 45°C. Estrazione con acqua (al 5% in NaCl), isopropanolo, esano/cloruro di metilene (5:1, v/v)	1) retinil palmitato e α -tocoferolo >85%	LOQ (μ mol/L): retinoidi=0.03 licopene, α -, β -carotene, β -criptoxantina, luteina, zeaxantina=0.02-0.04 tocoferoli=0.23 Risultati (μ mol/L): intero/parzialmente scremato/scremato. Retinolo=1.1/0.5/0.08 β -carotene=0.11/0.04/0.07 α -tocoferolo=2/1.1/0.9	Herrero- Barbudo et al., (2005) [49]
Retinolo, α -, β -carotene, licopene, luteina, zeaxantina, β -criptoxantina,	Latte crudo, latte pastorizzato intero e parzialmente scremato, burro, formaggio	HPLC-UV-Vis 325 nm retinolo 450 nm carotenoidi	Vydac 5 μ m, 250x3.2mm I.D. Eluizione in gradiente con metanol (A), acqua (B), THF (C), triethylamina (D). Flusso di 0.7 mL/min	1 mL di latte + 0.25 di ammoniac al 25% + 1 mL di etanol. Segue estrazione con dietil etero/etero di petrolio (1:1). Segue saponificazione sugli estratti portati a seccchezza con KOH (5% m/v) in etanol per 3 h segue estrazione con esano (3mL).	retinolo=99% luteina=74% zeaxantina=67% β -criptoxantina= 111% α -carotene=98% β -carotene= 102% licopene=101%	LOD: Non riportati. Risultati (μ g/100g): Crudo/pastorizzato intero retinolo=40.5/33.6 luteina=1.1/1.0 zeaxantina=0.1/0.1 β -criptoxantina=0.3/0.3 α -carotene=0.1/0.1 β -carotene=18.8/16.7	Hulshof et al., (2006) [6]

*in tabella sono riportati solo valori di recupero, limiti del metodo e risultati relativi al latte non fortificato.

Tabella 16: unico metodo analitico impiegato per l'analisi dei retinil esteri nel latte.

Retinoidi	Matrice	Strumentazione	Condizioni separative	Procedura di estrazione	Prestazioni del metodo		Autori, Anno [Riferimento]
					Recupero (%)	Limiti	
Retinolo, retinil caprilato, caprato, linolenato, laurato, linoleato, miristato, palmitoleato, pentadecanoato, oleato, palmitato, eicosanoato, eptadecanoato, stearato.	Latte vaccino, caprino, umano e di ratto	HPLC-UV ($\lambda=325$ nm)	Colonna Nova-Pak C ₁₈ (5 μ m) in tandem con colonna Rad-PAK C ₁₈ (5 μ m). Eluizione isocratica con acetonitrile:diclorometano (80:20, v/v). Flusso 2 mL/min.	Estrazione diretta con esano dalla frazione lipidica, precedentemente estratta dal latte con etere di petrolio in seguito a deproteinizzazione con etanolo. Soltanto per il latte caprino: clean-up mediante HPLC a fase normale su colonna di silice.	Non riportato	Non riportati	Woollard e Indyk, (1989) [8]

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1 MATERIALI E METODI

2.1.1 REAGENTI E PRODOTTI CHIMICI

Presso la Aldrich-Fluka-Sigma S.r.l. (Milano, Italia) sono stati acquistati i seguenti standard:

- *ergocalciferolo* o *vitamina D₂*;
- *colecalfiferolo* o *vitamina D₃*;
- *α-tocoferolo*;
- *γ-tocoferolo*;
- *δ-tocoferolo*;
- *fillochinone* o *vitamina K₁*;
- *menachinone-4* o *vitamina K₂*;
- **retinolo** o *vitamina A1* = (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcicloes-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraen-1-olo;
- *β-carotene* o *β,β-carotene*;
- *luteina* o *xantofilla* o *β,ε-carotene-3,3'-diolo*;
- *zeaxantina* o *β,β-carotene-3,3'-diolo*;
- *β-criptoxantina* o (3R)-*β,β-caroten-3-olo*;
- **retinil palmitato** = [(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcicloes-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraenil]esadecanoato.

Presso la Chemical Research 2000 S.r.l. (Roma, Italia) sono stati acquistati i seguenti standard:

- **retinil caprilato** = [(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcicloes-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraenil]ottanoato;
- **retinil caprato** = [(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcicloes-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraenil]decanoato;
- **retinil laurato** = [(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcicloes-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraenil]dodecanoato;

- **retinil miristato** = [(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcicloes-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraenil]tetradecanoato;
- **retinil pentadecanoato** = [(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcicloes-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraenil]pentadecanoato;
- **retinil eptadecanoato** = [(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcicloes-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraenil]eptadecanoato;
- **retinil stearato** = [(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcicloes-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraenil]ottadecanoato;
- **retinil eicosanoato** = [(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcicloes-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraenil]eicosanoato;
- **retinil linolenato** = [(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcicloes-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraenil](9Z,12Z,15Z)-ottadecatrienoato;
- **retinil palmitoleato** = [(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcicloes-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraenil](9Z-esadecenoato);
- **retinil linoleato** = [(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcicloes-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraenil](9Z,12Z-ottadecadienoato);
- **retinil oleato** = [(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilcicloes-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraenil](9Z-ottadecenoato).

α -Tocoferolo-d₆ [α -tocoferol-(5,7-dimetil-d₆)], colecalciferolo-d₃ [colecalfiferol-(6,19,19-d₃)], filloquinone-d₇ (phyloquinone-(5,6,7,8-d₄, 2-metil-d₃) and *trans*- β -apo-8'-carotenal, acquistati presso la Aldrich-Fluka-Sigma Chemical (Milan, Italy), erano scelti come standard interni per i vitameri E, i vitameri D, i vitameri K e i carotenoidi, rispettivamente. Il retinolo-d₅ [retinolo-(3,3-d₂, 2-metil-hyl-d₃) era acquistato dalla Chemical Research 2000 (Rome, Italy) e scelto come standard interno per il retinolo.

Per lo studio della composizione in vitameri A del latte, il **retinil propionato** = [(2E,4E,6E,8E) - 3,7 - dimetil - 9 - (2,6,6 - trimetilcicloes - 1 - enil) nona - 2,4,6,8 - tetraenil] propionato, acquistato sempre presso la Aldrich-Fluka-Sigma S.r.l. (Milano, Italia), era scelto come standard interno per i retinil esteri degli acidi grassi a media catena (da 8 a 12 atomi di carbonio), mentre il **retinil arachidonato** = [(2E,4E,6E,8E) - 3,7-dimetil - 9 - (2,6,6-trimetilcicloes-1-enil) nona-2,4,6,8 - tetraenil] (5Z,8Z,11Z,14Z)-

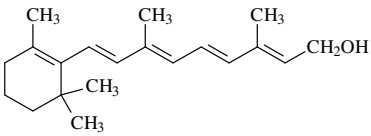
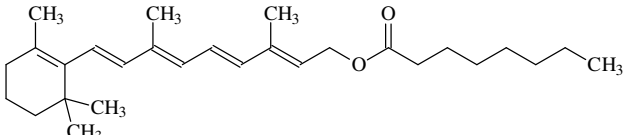
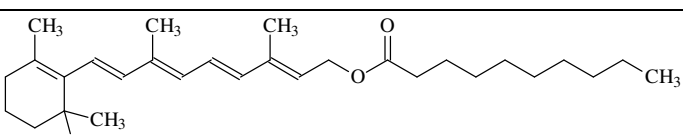
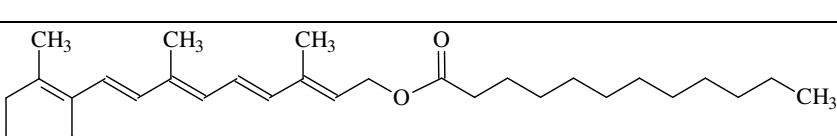
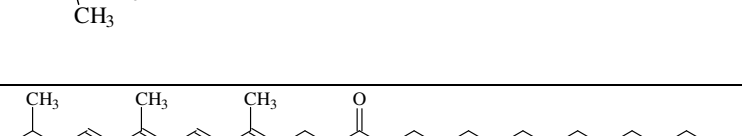
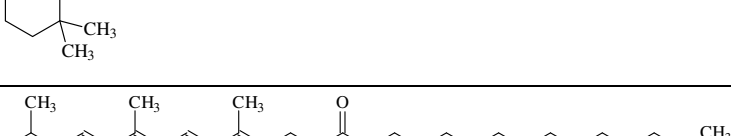
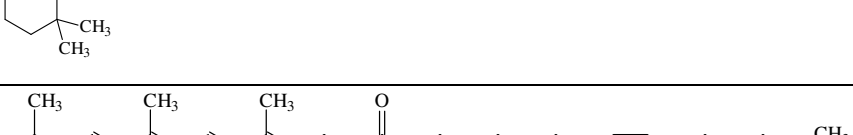
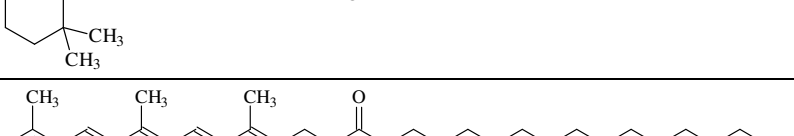
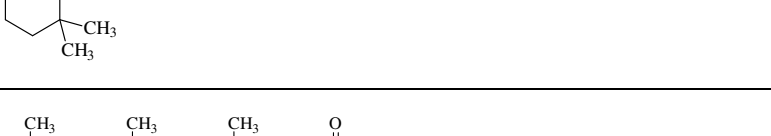
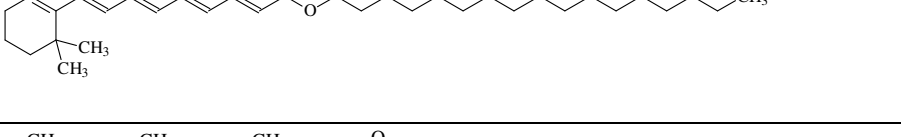
eicosatetraenoato, acquistato presso la Chemical Research 2000 S.r.l. (Roma, Italia) era selezionato come standard interno per i retinil esteri degli acidi grassi a catena più lunga.

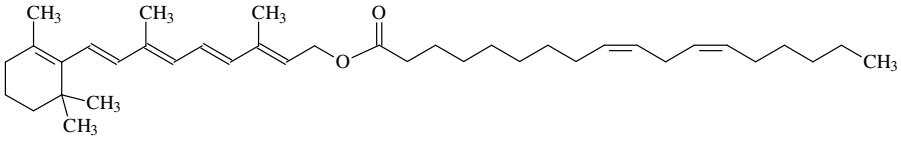
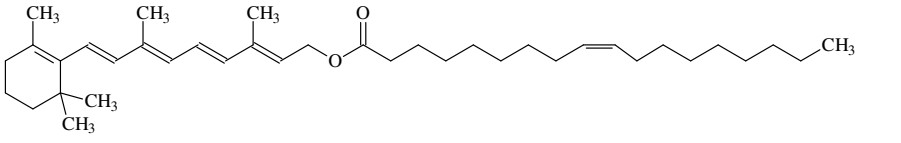
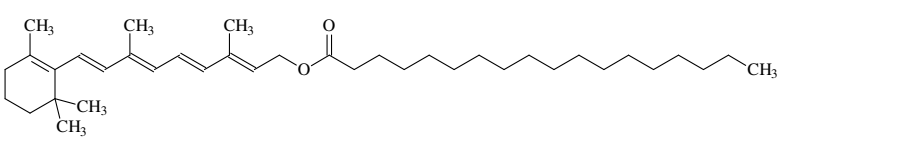
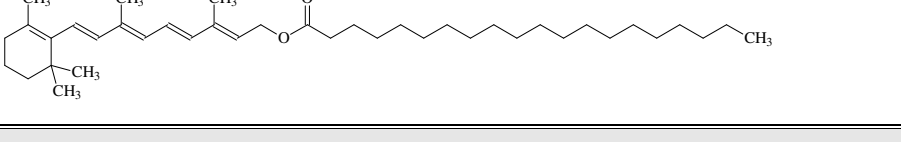
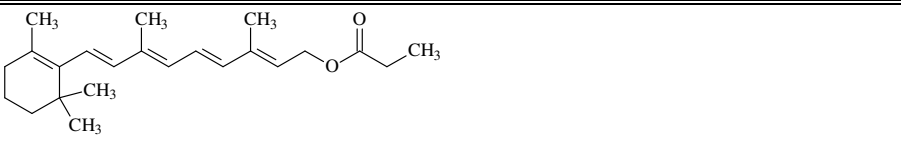
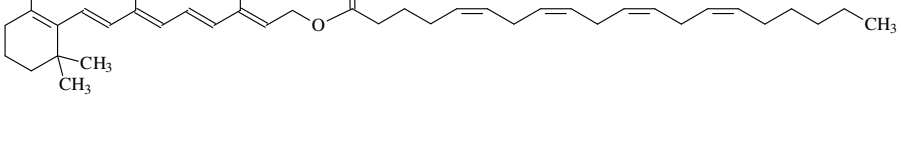
Tutti gli standard avevano una purezza superiore all'85% e sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione per realizzare la validazione del metodo e l'analisi quantitativa.

In tabella 17 sono riportati nomi, masse monoisotopiche e strutture dello standard interno e di tutti i retinoidi selezionati per questo lavoro di tesi.

Masse monoisotopiche e strutture dei vitameri D, E, K e dei carotenoidi selezionati per questo lavoro, sono riportati nel paragrafo 2.2.1 (Studio di frammentazione).

Tabella 17: strutture e masse monoisotopiche dei 14 retinoidi e degli standard interni selezionati per questo lavoro.

Retinoidi	Massa monoisotopica	Struttura
<i>Retinolo</i>	286.23	
<i>Caprilato</i>	412.33	
<i>Caprato</i>	440.37	
<i>Laurato</i>	468.40	
<i>Miristato</i>	496.43	
<i>Pentadecanoato</i>	510.44	
<i>Palmitoleato</i>	522.44	
<i>Palmitato</i>	524.46	
<i>Eptadecanoato</i>	538.47	
<i>Linolenato</i>	546.44	

Retinoidi	Massa monoisotopica	Struttura
<i>Linoleato</i>	548.46	
<i>Oleato</i>	550.47	
<i>Stearato</i>	552.49	
<i>Eicosanoato</i>	580.52	
Standard interno	Massa monoisotopica	Struttura
<i>Propionato</i>	342.25	
<i>Arachidonato</i>	572.46	

Toluene idrossibutilato (BHT) è stato utilizzato come antiossidante sia nella preparazione delle soluzioni di lavoro che nei solventi impiegati durante la fase di estrazione degli analiti dal latte; è stato acquistato sempre presso la Sigma-Aldrich.

Tra i solventi utilizzati, il metanolo, l'isopropanolo, l'esano e il diclorometano (di grado RS) e l'etanolo (di grado RPE) sono stati acquistati presso la Carlo Erba (Milano, Italia).

L'acqua distillata, utilizzata nel processo di estrazione, è stata purificata e deionizzata mediante un apparecchio Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, USA). Acetonitrile e metanolo (grado RS-PLUS), cloroformio (grado RS), isopropanolo (grado RS), esano (grado RS), etanolo assoluto (grado RPE) e potassa sono stati acquistati presso la Sigma-Aldrich.

2.1.2 CAMPIONI DI LATTE

I campioni di latte crudo provenienti da specie animali diverse sono stati ottenuti da produttori diretti del centro Italia (Lazio) con sistemi di alimentazione basati sul pascolo. I campioni di latte vaccino, bufalino e asinino sono stati prelevati da silos in acciaio utilizzati per il loro stoccaggio, mentre il latte caprino e ovino sono stati campionati direttamente da un singolo animale donatore. Tutti i campioni sono stati conservati a 4°C per 1 giorno, ripartiti in falcon da 50 mL e quest'ultimi conservati a -18°C. Il giorno dell'analisi, i campioni erano scongelati e sottoposti ad agitazione per 15 min prima del dosaggio. La percentuale dei grassi nei campioni sono state dichiarate dai produttori: circa 1,0% (w/v) di latte di asina, 3,5% (w/v) di latte di mucca, 5,0% (w/v) per bufala e capra, e il 5,5% (w/v) per il latte di pecora.

2.1.3 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI LAVORO

Dagli standard, solidi o liquidi, sono state preparate per pesata le soluzioni individuali degli analiti (*stock solutions*). In tabella 18 sono riportate le concentrazioni e la frequenza con cui sono state preparate le stock solutions di retinolo, vitameri D, E, K e carotenoidi.

Tabella 18: concentrazioni e frequenza di preparazione delle soluzioni individuali degli analiti selezionati per questo studio.

Preparazione mensile	Preparazione quindicinale	
1 µg/µL	1 µg/µL	500 ng/µL
in metanolo 0,1% (m/v) in BHT	in cloroformio 0,1% (m/v) in BHT	
Retinolo	β-carotene	Luteina ^a
α-tocoferolo		
γ-tocoferolo		
δ-tocoferolo		Zeaxantina
Ergocalciferolo		
Colecalciferolo		β-cryptoxantina
Menachinone-4		
Fillocchinone		

^a sonicando per 6 min a 30°C;

^b sonicando per 6 min.

Le stock solutions dei retinil esteri sono state preparate alla concentrazione di $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ utilizzando: diclorometano allo 0.1% (w/v) in BHT, al fine di evitare una possibile reazione di transesterificazione. In tutti i casi le soluzioni venivano sottoposte ad ultrasuoni per alcuni minuti.

Lo studio di stabilità effettuato (vedi paragrafo 2.4.1) mostrava che le soluzioni potevano essere utilizzate entro un mese dalla loro preparazione.

Le soluzioni standard di lavoro di tutti gli analiti sono state preparate per diluizione in metanolo a partire dalle soluzioni individuali, arrivando alle concentrazioni più adeguate per i successivi studi ed esperimenti.

Tutte le soluzioni delle vitamine erano conservate a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, avvolgendo i contenitori con fogli di alluminio per evitarne la fotodegradazione. Sulla base delle schede tecniche fornite dalla azienda produttrice, gli standard in polvere erano conservati a temperature comprese tra -80 e $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.4 PROCEDURA DI ESTRAZIONE

a. Saponificazione a freddo per vitamine liposolubili e carotenoidi

La saponificazione a freddo, lasciata decorrere per tutta la notte, è stata utilizzata per estrarre le vitamine liposolubili e i carotenoidi dai differenti tipi di latte. Tutte le operazioni preliminari e successive erano condotte al riparo dalla luce diretta.

Sei *mL* di latte crudo erano trasferiti in un tubo da centrifuga da 50 *mL* in polietilene munito di tappo a vite (falcon), addizionati con 18 *mL* di etanolo assoluto allo 0.1% (w/v) in BHT e con *x mL* di una soluzione acquosa di KOH al 50% (w/v) ($x = 1\text{ mL}$ per il latte di asina e mucca, 3 *mL* per il latte di bufala, capra e pecora). Il tubo era tappato e collocato in un bagno ad acqua termostata alla temperatura di $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, sotto agitazione magnetica, per tutta la notte (15 ore).

Al termine del periodo di incubazione, il digerito era diluito con 8.5 *mL* di H_2O milliQ e gli analiti erano estratti con due aliquote da 12 *mL* di esano allo 0.1% (w/v) in BHT. L'estrazione era ripetuta due volte per il latte di mucca e quello di asina, tre volte per il latte di bufala, e quattro volte per il latte di capra e quello di pecora, a seconda delle diverse quantità endogene dell'analita. Dopo l'aggiunta di ogni aliquota, la miscela era sottoposta ad agitazione, su stirrer per 5 minuti e su vortex per ulteriori 5 minuti, e poi centrifugata a 6000 *rpm* a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 10 minuti per favorire la separazione tra precipitato proteico, fase acquosa e fase organica.

Gli estratti organici, ottenuti dalle successive estrazioni, erano riuniti e dibattuti con 12 *mL* di acqua milliQ per due volte; l'eliminazione degli alcali residui era verificata mediante saggio della fenoltaleina.

A questo punto, l'estratto era concentrato ad un volume di 100 μL , per evaporazione a 30 °C sotto un leggero flusso di azoto, e portato ad un volume finale di 200 μL con una soluzione di isopropanolo:esano (75:25, v/v) allo 0.1% (w/v) in BHT. Infine, 20 μL erano iniettati nel sistema HPLC-DAD-tandem MS.

b. Estrazione diretta per i retinil esteri

L'analisi e il recupero dei retinoidi dal latte crudo delle diverse specie animali selezionate sono stati condotti mediante estrazione diretta, effettuando inizialmente una deproteinizzazione con etanolo e quindi un'estrazione liquido-liquido con esano, secondo il protocollo di seguito descritto.

Tutte le operazioni erano eseguite al riparo dalla luce diretta.

Sei *mL* di latte crudo erano trasferiti in un tubo da centrifuga in polietilene da 50 *mL*, munito di tappo a vite, e addizionati di 18 *mL* di etanolo allo 0.1% (w/v) in BHT. La miscela era sottoposta all'azione degli ultrasuoni per 6 minuti e quindi addizionata con 12 *mL* di esano allo 0.1% (w/v) in BHT sotto agitazione, su stirrer per 5 minuti e su vortex per 1 minuto. Successivamente, la miscela era posta in un bagno ad ultrasuoni per 6 minuti, centrifugata a 6000 *rpm* per 10 minuti a 0 °C e lo strato superiore di esano prelevato.

L'estrazione era ripetuta per altre due volte secondo la procedura appena descritta, utilizzando aliquote da 6 *mL* di esano. I tre surnatanti erano riuniti e, al fine di favorire la precipitazione della frazione lipidica coestratta, posti alla temperatura di -18 °C per 1 ora e poi centrifugati a 0 °C a 6000 *rpm* per 10 minuti.

Nel caso del latte di bufala, a causa del maggior quantitativo di lipidi presenti, era necessario modificare quest'ultima parte della procedura estrattiva. Una volta riuniti, i tre estratti organici erano concentrati (per evaporazione in bagno ad acqua termostata a 30 °C, sotto un leggero flusso di azoto), conservati a bassa temperatura (-18 °C per 40 minuti) e centrifugati (0 °C a 6000 *rpm* per 10 minuti), per due volte, con le seguenti modalità:

- l'estratto complessivo (~ 24 *mL*) era concentrato fino al volume di 2 *mL*, posto a -18 °C e quindi centrifugato;
- il surnatante era prelevato e posto in una provetta di vetro a fondo conico, evaporato fino ad un volume di 1 *mL*, conservato a -18 °C per altri 40 minuti ed infine centrifugato.

Per tutti i tipi di latte analizzato l'ultimo surnatante, prelevato e posto in una provetta di vetro a fondo conico, era addizionato di 25 μL di una soluzione contenente lo standard interno alla concentrazione di 5 ng/ μL ed evaporato a 30 °C sotto un leggero flusso di azoto fino ad un volume di 250 μL .

L'estratto finale era portato ad un volume di 500 μL con una soluzione di isopropanolo:esano, 75:25 (v/v) allo 0.1% (w/v) in BHT. Venti μL erano infine iniettati nel sistema HPLC-DAD-MS/MS.

2.1.5 CROMATOGRAFIA LIQUIDA

a. Cromatografia per vitamine liposolubili e carotenoidi

La cromatografia liquida è stata realizzata mediante un sistema micro HPLC Series 200-Micro LC Pump (Perkin Elmer, Norwalk, CT), provvisto di autocampionatore Series 200 Autosampler (equipaggiato con un loop da 50 μL) e degassatore Series 200 Vacuum Degasser.

Gli analiti erano separati mediante *non aqueous reversed phase chromatography (NARP chromatography)*.

Un **sistema tandem di colonne C₁₈** [Supelcosil™ C₁₈ (5 μm , x 50 mm x 4.6 mm ID) da Supelco-Sigma-Aldrich (Bellefonte, PA, USA) + Alltima C₁₈ (5 μm , x 250 mm x 4.6 mm ID) da Grace-Alltech (Deerfield, IL, USA)] era assemblato in serie per incrementare l'efficienza nel separare le **vitamine liposolubili** dagli interferenti isobarici della matrice.

I **carotenodi** erano separati su una **colonna ProntoSIL C₃₀** (3 μm , 250 mm x 4,6 mm I.D.; Bischoff Chromatography, Leonberg, Germania), termostata a 19 °C e preceduta da una precolonna dello stesso tipo (5 μm , 10 mm x 4,0 mm I.D.).

La composizione della fase mobile non-acquosa, consistente in metanolo (fase A) e una soluzione isopropanolo:esano (50:50, v/v) (fase B), era la stessa per entrambe le separazioni cromatografiche ed era introdotta direttamente nel sistema di rivelazione DAD-MS/MS ad una velocità di flusso di 1 mL min^{-1} . I profili dei gradienti lineari applicati erano i seguenti (t in min):

- t₀, B = 0%; t₁, B = 0%; t₁₅, B = 75%; t_{15.1}, B = 99.5%; t₂₂, A = 99.5% per separare le vitamine liposolubili sul sistema tandem di colonne C₁₈;

- t₀, B = 0%; t₁, B = 0%; t₁₅, B = 75%; t_{15.1}, B = 99.5%; t₃₀, A = 99.5% per separare i carotenoidi sulla colonna C₃₀.

Lo 0.5% di metanolo era necessario per favorire la ionizzazione APCI degli analiti con più elevati fattori di capacità, specialmente nel caso dei carotenoidi.

Gli analiti erano rivelati ed identificati mediante uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo, equipaggiato con una sorgente APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) operante in modalità di ionizzazione positiva. L'accoppiamento on-line di un detector UV-vis a serie di diodi (450 nm) coadiuvava l'identificazione dei carotenoidi ed, in particolare, dei loro isomeri geometrici.

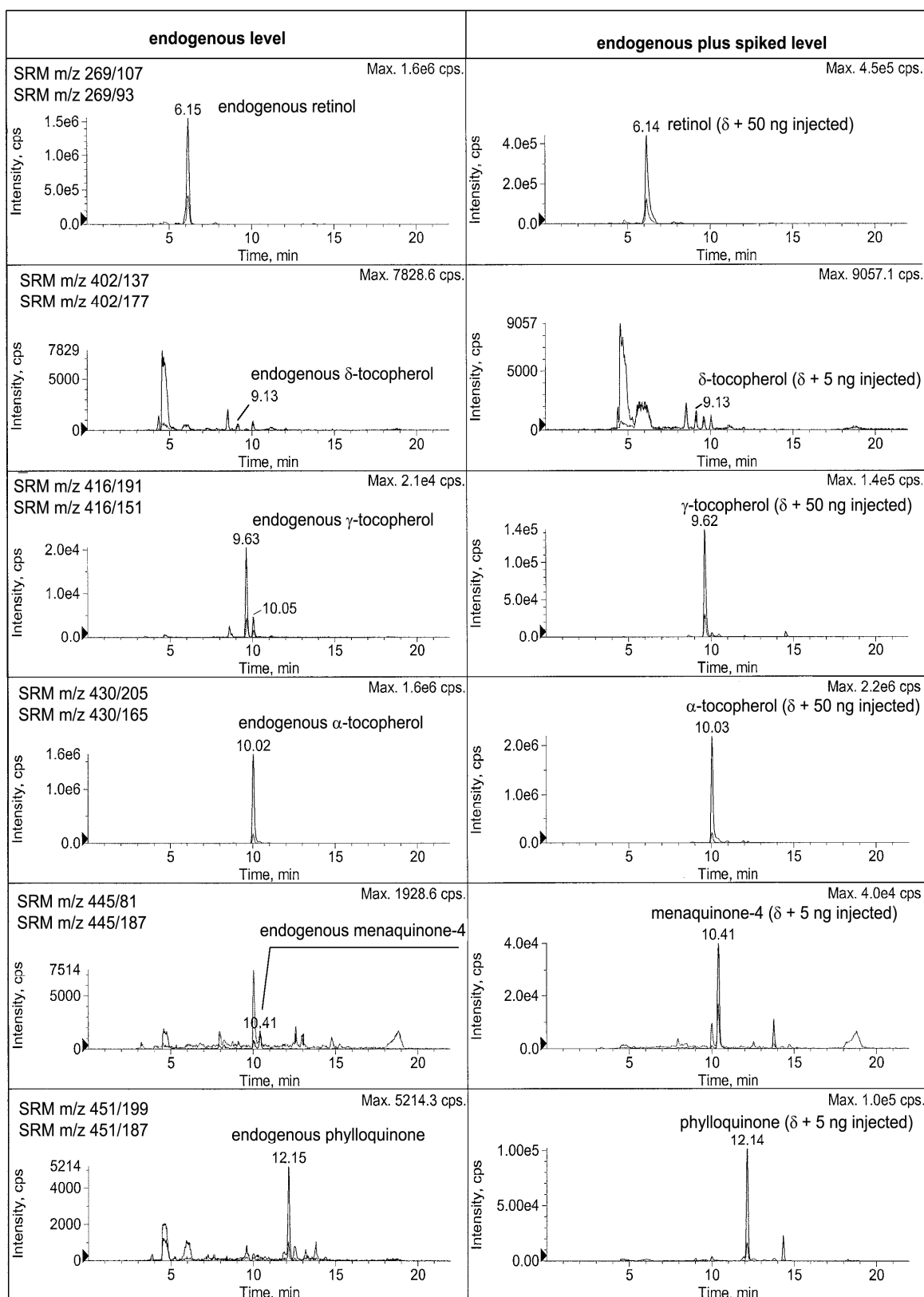


Figura 22: cromatogramma-SRM acquisito in ionizzazione positiva con la sorgente APCI per la separazione (su accoppiamento colonne Supelcosil™ C₁₈-Alltima C₁₈) delle vitamine liposolubili estratte da un campione di latte crudo di pecora. Ciascuna forma è stata inequivocabilmente identificata sulla base del tempo di ritenzione, delle due transizioni SRM selezionate e della loro abbondanza relativa (rapporto ionico).

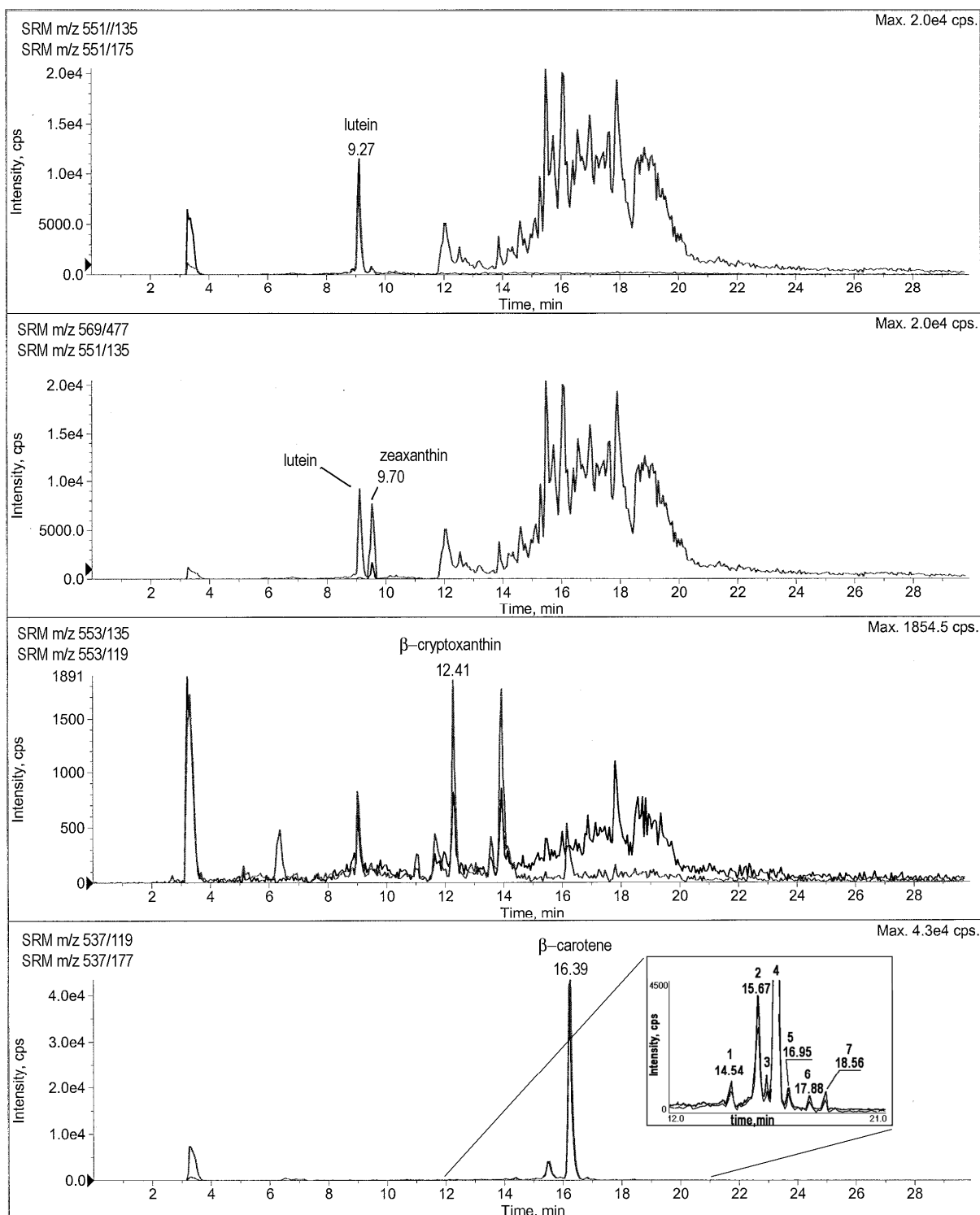


Figura 23: cromatogramma-SRM acquisito in ionizzazione positiva con la sorgente APCI per la separazione (su colonna C_{30}) dei quattro carotenoidi target estratti da un campione di latte bovino. Nell'ingrandimento del profilo della corrente ionica del β -carotene (transizioni SRM m/z 537/177 e 537/119) è possibile notare la presenza di ulteriori picchi cromatografici, che sono stati identificati grazie alla combinazione della rivezione MS ed UV (vedere paragrafo 2.2.2).

b. Cromatografia per i retinil esteri

La cromatografia liquida è stata realizzata mediante un sistema micro HPLC Series 200-Micro LC Pump (Perkin Elmer, Norwalk, CT), provvisto di autocampionatore Series 200 Autosampler (equipaggiato con un loop da 50 μL) e degassatore Series 200 Vacuum Degasser.

Gli analiti erano rivelati ed identificati mediante uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo, equipaggiato con una sorgente APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) operante in modalità di ionizzazione positiva.

Per retinolo e retinil esteri i segnali più intensi erano associati a transizioni SRM (selected reaction monitoring) del tipo [retinolo deidratato]⁺/frammento (tabella 20), a causa della scissione degli stessi in sorgente APCI (vedi paragrafi 2.1.6 e 2.2.1). La selezione di queste transizioni SRM, scarsamente diagnostiche, rendeva indispensabile per la loro identificazione la conoscenza del tempo di ritenzione e quindi il raggiungimento di una completa separazione cromatografica.

A tale scopo sono stati utilizzati due diversi sistemi tandem di colonne cromatografiche a fase inversa:

- Il primo era un accoppiamento C_{18}/C_{18} costituito da una colonna *SupelcosilTM C₁₈* (5 μm , 50 mm x 4.6 mm I.D.) (Supelco-Sigma Aldrich, Bellefonte, PA, USA) e da una colonna *Alltima C₁₈* (5 μm , 250 mm x 4.6 mm I.D.) (Alltech, Deerfield, IL, USA).
- Il secondo era un accoppiamento C_{18}/C_{30} costituito da una colonna *TSKgel Super-ODS* (2 μm , 100 mm x 4.6 mm I.D.) (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Germania) e da una colonna *Prontosil C₃₀* (3 μm , 250 mm x 4.6 mm I.D.) (Bischoff Chromatography, Leonberg, Germania). In questo caso, il sistema era termostato a 19 °C.

In entrambi i casi, la fase mobile era costituita da metanolo (fase A) e da una miscela (50:50, v/v) di isopropanolo/esano (fase B). La fase B era usata anche per il lavaggio dell'ago dell'autocampionatore.

Alla velocità di flusso di 1 mL/min, l'eluizione è stata condotta secondo lo schema seguente:

step 1: 1 min al 100% di fase A;

step 2: in 20 min la fase B aumentava linearmente dallo 0% al 50%;

step 3: in 0.1 min la fase B aumentava dal 50% al 99,5%;

step 4: 10 min al 99.5% (lo 0.5% di metanolo era necessario per favorire la ionizzazione APCI degli analiti con più elevati fattori di capacità).

Il primo accoppiamento di colonne era in grado di assicurare la separazione di tutti i retinoidi selezionati, con l'eccezione delle coppie: retinil palmitoleato/miristato ($t_r = 17.1$ min), a loro volta solo parzialmente risolti rispetto al retinil linoleato ($t_r = 17.4$ min), e retinil oleato/palmitato ($t_r = 18.8$ min).

Il secondo accoppiamento consentiva la corretta identificazione di retinil oleato, retinil palmitato e retinil miristato (completamente separati); rimaneva invece irrisolta la non completa separazione di retinil palmitoleato e retinil linoleato.

Nelle figure 22 e 23 sono riportati i profili cromatografici ottenuti con i due sistemi tandem di colonne impiegati, acquisiti in modalità SRM (Selected Reaction Monitoring), relativi ad una soluzione di lavoro dei retinoidi selezionati per questo studio.

Di seguito si riporta la legenda per l'identificazione dei picchi cromatografici.

Picco	Identificazione	Picco	Identificazione	Picco	Identificazione	Picco	Identificazione
1	Retinolo	5	Retinil laurato	9	Retinil linoleato	13	Retinil palmitato
2	Retinil propionato	6	Retinil linolenato	10	Retinil miristato	14	Retinil eptadecanoato
3	Retinil caprilato	7	Retinil arachidonato	11	Retinil oleato	15	Retinil stearato
4	Retinil caprato	8	Retinil palmitoleato	12	Retinil pentadecanoato	16	Retinil eicosanoato

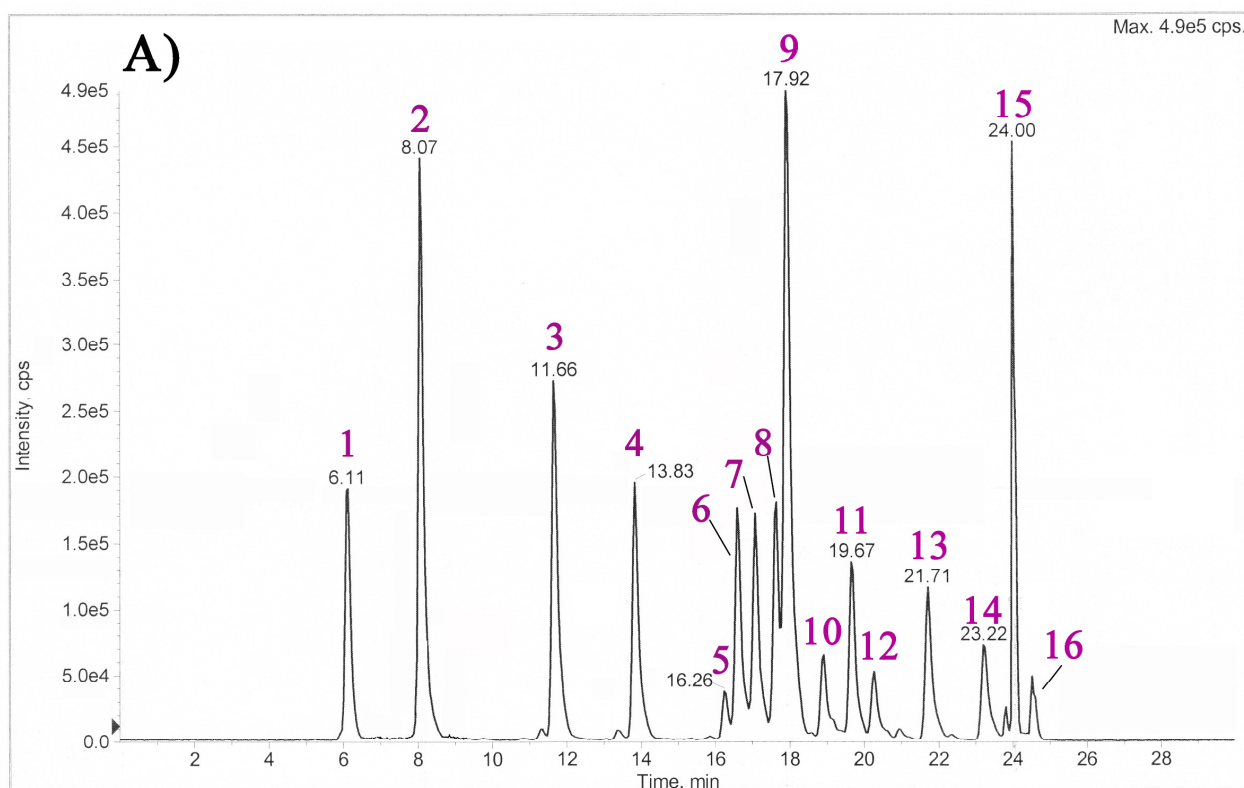


Figura 24: cromatogramma SRM, acquisito in ionizzazione positiva con la sorgente APCI, per la separazione su sistema TSKgel Super-ODS+Prontosil C₃₀ degli analiti selezionati (20 ng iniettati). Viene riportata la corrente SRM 269/119 m/z, comune per retinolo e retinil esteri.

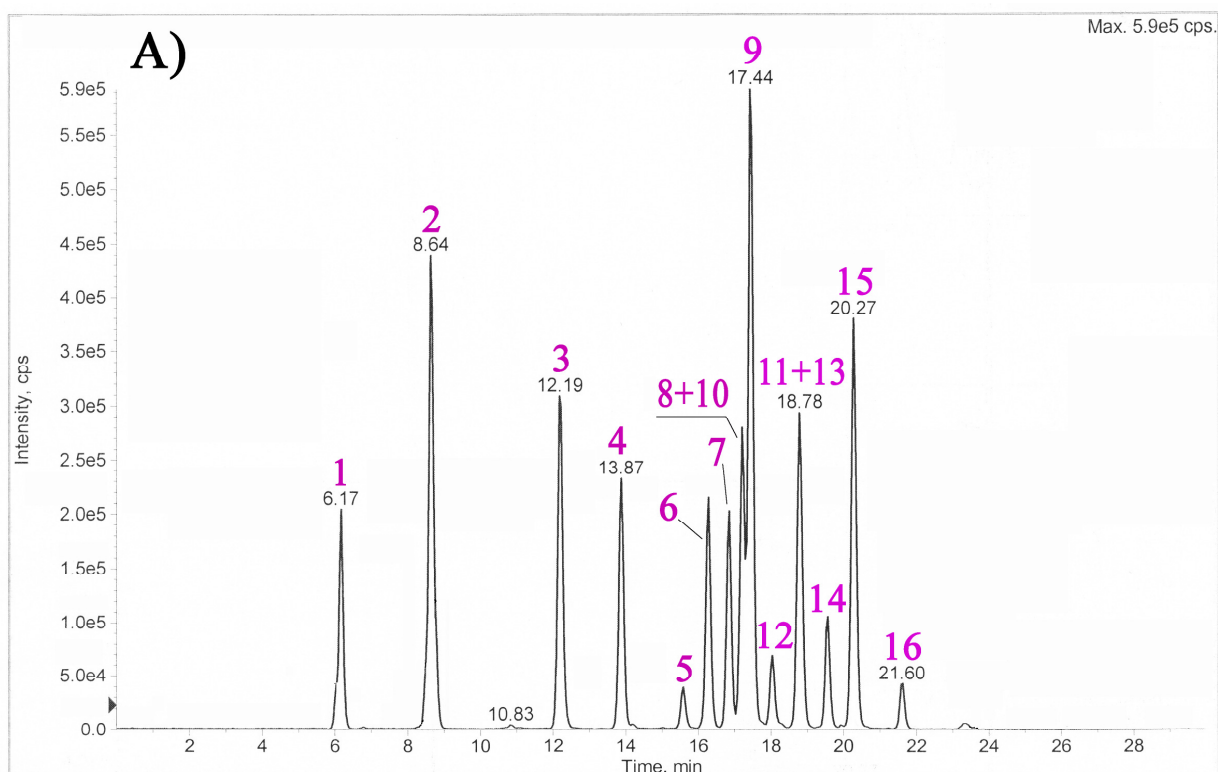


Figura 25: cromatogramma SRM, acquisito in ionizzazione positiva con la sorgente APCI, per la separazione su sistema Supelco+AlltimaC₁₈ degli analiti selezionati (20 ng iniettati). Viene riportata la corrente SRM 269/119 m/z, comune per retinolo e retinil esteri.

2.1.6 SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM (MS/MS)

Per ognuno dei metodi sviluppati in questo lavoro l'HPLC era interfacciato con uno spettrometro di massa tandem a triplo quadrupolo MDS-Sciex API 4000 Qtrap (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), equipaggiato con sorgente *Turbo V* dotata di sonda APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization). La rivelazione era condotta in ioni positivi, applicando all'ago della scarica a corona una corrente pari a 3 μ A ed impostando la temperatura del nebulizzatore pneumatico a 450 °C.

Azoto purissimo, proveniente da un generatore (Parker-Balston modello 75A74, Haverhill, MA, USA) collegato ad un compressore (Jun-Air 4000-40M, Bromsgrove, UK), era utilizzato come curtain gas (Flusso = 5 L/min) e CAD gas (Collision Activated Decomposition gas, alla pressione di $4 \cdot 10^{-5}$ torr), mentre l'aria generata dallo stesso compressore era usata come nebulizer gas (Flusso = 2 L/min) e gas di make-up (P = 30 psi)

La calibrazione di massa di ogni analizzatore (Q1 e Q3) era realizzata con una soluzione standard di polipropilenglicole (PPG), infuso nello spettrometro di massa con velocità di flusso di 10 μ L/min. La capacità del PPG di fornire tagli molecolari caratteristici (59.0, 175.1, 384.3, 616.5, 906.7, 1254.9, 1545.1, 1778.3 Da) consente di calibrare simultaneamente lo strumento nell'intero range di

massa (20-2800 m/z) e di regolare la larghezza dei picchi a metà altezza ad un valore di 0.7 ± 0.1 m/z , corrispondente ad un potere risolvante unitario.

I cromatogrammi LC-MS/MS erano acquisiti in modalità Selected-Reaction-Monitoring (SRM), selezionando due transizioni ione precursore/ione frammento per ogni analita.

Le transizioni SRM erano individuate durante lo studio di frammentazione, condotto lavorando in FIA (Flow Injection Analysis) con gli standards in solvente, ed erano scelte sulla base del segnale assoluto tra tutte quelle possibili. Al fine di ottenere la massima trasmissione delle correnti ioniche, si procedeva con l'ottimizzazione dei voltaggi applicati ai vari componenti dell'ottica strumentale quali il Declustering Potential (DP), l'Entrance Potential (EP), la Collision Energy (CE) e il Cell Exit Potential (CXP).

Il programma usato per acquisire ed elaborare i dati LC-MS era *Analyst 1.5.1*.

Per ciascuno di questi analiti, sono state selezionate le due transizioni SRM più intense e con la minima interferenza da parte della matrice, sulla base della valutazione del rapporto segnale/rumore cromatografico in solvente, prima, e su campioni di controllo, in un secondo momento.

La transizione più intensa (*quantifier*) era impiegata per l'analisi quantitativa, mentre quella meno intensa (*qualifier*) per la stima dei limiti del metodo. In tal modo, gli elementi utilizzati per l'identificazione di ciascun analita erano il tempo di ritenzione, la rivelazione dello ione pseudomolecolare e di due frammenti caratteristici, e la valutazione delle abbondanze relative delle due transizioni.

Per garantire l'identificazione degli analiti, ci si è ispirati ai criteri indicati dalla Decisione della Commissione Europea 657 del 2002 per confermare la presenza di contaminanti negli alimenti di origine animale.

a. vitamine liposolubili e carotenoidi

I parametri ottimizzati per l'analisi quantitativa dei dodici vitameri target e lo screening dei carotenoidi sono riportati in tabella 19.

Tabella 19: Parametri LC-MS utilizzati per l'identificazione delle vitamine liposolubili e dei carotenoidi.

Vitamine	Tempo di ritenzione ^a	Transizioni SRM Qualifier e quantifier ^b	Potenziale di Declustering (V)	Potenziale di Collision (V)	Rapporto Ionico ^c
	Media \pm DS (min)				Media \pm DSR (%)
Retinolo	6.14 \pm 0.02	269.1/107.1 269.1/93.1	40	40 30	33 (6)
δ -tocoferolo	9.13 \pm 0.02	402.4/137.0 402.4/177.2	40	40 35	75 (6)
Ergocalciferolo	9.46 \pm 0.01	397.3/107.1 397.3/379.3	50	42 25	94 (5)
γ -tocoferolo	9.62 \pm 0.02	416.3/191.2 416.3/151.1	60	40	23 (5)
Colecalciferolo	9.64 \pm 0.01	385.3/259.2 385.3/367.3	30 30	40 25	69 (5)
α -tocoferolo	10.02 \pm 0.02	430.2/205.1 430.2/165.1	65	40 45	9 (6)
Menachinone-4	10.41 \pm 0.01	445.3/81.3 445.3/187.1	80	60 40	41 (10)
Fillocchinone	12.16 \pm 0.01	451.5/199.2 451.5/187.1	65	41 35	16 (7)
Standar Interni					
retinol-d ₅	6.10 \pm 0.02	275.2/95.1	40	40	-
cholecalciferol-d ₃	9.63 \pm 0.01	388.3/370.2	40	30	-
α -tocopherol-d ₆	9.98 \pm 0.01	436.4/171.2	40	45	-
phyloquinone-d ₇	12.07 \pm 0.01	458.4/194.1	73	40	-
Carotenoidi					
Luteina	9.27 \pm 0.02	551.4/135.2 551.4/175.0	20	50 40	85 (9)
Zeaxantina	9.70 \pm 0.02	569.4/477.2 551.4/135.2	30 20	23 40	32 (8)
β -cryptoxantina	12.41 \pm 0.01	553.5/135.1 553.5/119.1	60	45 55	54 (9)
β -carotene	16.39 \pm 0.02	537.5/119.1 537.5/177.2	30	60 40	78 (9)
Standard Interno					
<i>trans</i> - β -apo-8'-carotenale	11.41 \pm 0.02	417.3/177.1	80	20	-

^aI tempi di ritenzione sono riportati come media aritmetica di dieci replicate più la corrispondente deviazione standard (DS). Essi sono riferiti al sistema tandem di colonne C₁₈ per le vitamine liposolubili e alla colonna C₃₀ per i carotenoidi.

^bLa prima linea riporta la transizione SRM meno intensa (qualifier) e la seconda la più intensa (quantifier).

^cL'abbondanza relativa tra le transizioni SRM (rapporto ionico) viene calcolata come rapporto percentuale di Intensità Qualifier / Intensità Quantifier, i risultati sono riportati come media aritmetica di dieci replicate più la corrispondente deviazione standard relativa (DSR).

b. Retinoidi

Durante lo studio di ionizzazione e frammentazione degli analiti (paragrafo 2.2.1), nel caso dei sedici retinil esteri (quattordici analiti più due standard interni) era possibile osservare la scissione nella sorgente APCI e la generazione di uno ione intenso $[\text{retinolo}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ a $269\ m/z$, che risultava essere il picco base. Probabilmente l'elevata temperatura operativa della sorgente APCI causa una degradazione termica degli esteri, che si muovono lungo la colonna cromatografica con dei fattori di capacità caratteristici e più alti di quello della vitamina A, ma si scindono in sorgente liberando retinolo. Pertanto, l'estrazione delle correnti SRM del $269\ m/z$ dal segnale TIC (Total Ion Current) di un cromatogramma relativo ad una miscela di lavoro, mostra i picchi cromatografici relativi rispettivamente al retinolo e ai retinil esteri selezionati (vedi tabella 21 e figure 22 e 23).

Questo comportamento degli esteri verso la ionizzazione APCI da una parte risulta controproducente, in quanto genera uno ione precursore scarsamente diagnostico, motivo per cui si rendeva necessaria una completa separazione cromatografica; d'altra parte, però, risulta anche vantaggioso ed utilizzabile per mettere a punto un metodo di screening in grado di evidenziare la presenza di eventuali esteri del retinolo presenti in una matrice reale (alimentare o biologica), senza ricorrere all'uso di standard spesso costosi o di difficile reperibilità.

Tabella 20: voltaggi applicati all'ottica strumentale per conseguire la massima trasmissione ionica delle correnti ioniche selezionate.

ANALITI	Transizioni SRM ¹	DP ² (V)	EP ³ (V)	CE ⁴ (V)	CXP ⁵ (V)
Retinolo e retinil esteri ⁶	269/199	65	11	35	8
	269/119			28	12
	269/93			33	8

¹ La prima linea riporta la transizione SRM meno intensa (*qualifier*) e la seconda la più intensa (*quantifier*); il tempo di campionamento di ogni transizione (*dwell time*) era di 100 ms.

² Il *Declustering Potential* (DP) è la differenza tra i voltaggi applicati all'orifizio e allo skimmer.

³ L'*Entrance Potential* è il potenziale applicato al quadrupolo di origine o di declustering (Q0); Q0 focalizza e trasferisce gli ioni dalla vacuum interface al Q1.

⁴ La *Collision Energy* (CE), indicata erroneamente come un'energia dal software, è la differenza tra i voltaggi applicati al quadrupolo di declustering Q0 e alla cella di collisione Q2.

⁵ Il *Cell Exit Potential* focalizza e accelera gli ioni in uscita dalla cella di collisione (Q2); è la differenza di potenziale tra Q2 e la lente posizionata tra Q2 e Q3 (ST3).

⁶ Nel caso dei retinil esteri, le due transizioni SRM riportate risultavano effettivamente le più intense, ma l'ordine relativo era diverso per ogni singolo analita e viene riportato nella tabella 21.

Tabella 21: parametri LC-APCI-MS ottimizzati per l'acquisizione SRM dei retinoidi selezionati in questo studio.

ANALITI	<i>TSKgel+C30</i> tempo di ritenzione ¹ (DSR), min (%)	<i>Supelco+Alltima</i> tempo di ritenzione ¹ (DSR), min (%)	Transizioni SRM ²	Abbondanza Relativa ^{1,3} (DSR) (%)	Tolleranza rapporti ionici 657/2002/CE ⁴ (%)
Retinolo	6.10 (±1.4)	6.1 (±1.6)	269/199 269/119	92 (±10)	± 20
Retinil caprilato	11.70 (±0.7)	12.2 (±0.8)	269/199 269/119	91 (±13)	± 20
Retinil caprato	13.88 (±0.7)	13.9 (±0.7)	269/119 269/199	98 (±12)	± 20
Retinil laurato	16.25 (±0.6)	15.5 (±1.3)	269/199 269/119	84 (±9)	± 20
Retinil linolenato	16.6 (±0.6)	16.3 (±1.2)	269/119 269/199	89 (±19)	± 20
Retinil palmitoleato	17.70 (±0.5)	17.1 (±0.6)	269/119 269/199	98 (±15)	± 20
Retinil miristato	18.90 (±0.4)		269/199 269/119	90 (±11)	± 20
Retinil linoleato	17.92 (±0.5)	17.4 (±0.6)	269/119 269/199	95 (±18)	± 20
Retinil pentadecanoato	20.38 (±0.4)	18.1 (±1.1)	269/199 269/119	85 (±15)	± 20
Retinil oleato	19.7 (±0.7)	18.8 (±1.1)	269/199 269/119	72 (±14)	± 20
Retinil palmitato	21.7 (±1.4)		269/199 269/119	77 (±17)	± 20
Retinil eptadecanoato	23.2 (±0.9)	19.7 (±1.0)	269/119 269/199	100 (±20)	± 20
Retinil stearato	24.00 (±0.2)	20.3 (±1.0)	269/199 269/119	77 (±16)	± 20
Retinil eicosanoato	24.50 (±0.3)	21.6 (±1.4)	269/93 ⁵ 269/119	59 (±14)	± 20
Retinil propionato (S.I.)	8.07 (±0.4)	8.64 (±0.7)	269/199	–	–
Retinil archidonato (SI)	17.15 (±0.5)	16.7 (±1.2)	269/199 269/119	90 (±9)	± 20

¹Il tempo di ritenzione e l'abbondanza relativa delle due transizioni SRM di ogni analita sono riportati come valori medi, associati alle rispettive deviazioni standard relative, stimati attraverso l'analisi di 20 campioni di controllo analizzati in diverse sessioni analitiche, nell'arco di 1 mese. Le variazioni sul tempo di ritenzione sono considerate accettabili dalla Decisione 2002/657/CE quando rientrano tra ± 2.5%.

²La prima linea riporta la transizione SRM meno intensa (*qualifier*) e la seconda la più intensa (*quantifier*).

³L'abbondanza relativa tra le transizioni SRM (rapporto ionico) di ogni analita è calcolata come rapporto Intensità Qualifier/Intensità Quantifier.

⁴Le massime tolleranze permesse dipendono dall'abbondanza relativa, secondo quanto riportato nella seguente tabella estratta dalla Decisione 657/2002/CE:

Abbondanza relativa (% del picco base)	Tecniche analitiche: CI-GC, GC-MS ⁿ , LC-MS, LC-MS ⁿ
> 50%	± 20%
> 20% fino a 50%	± 25 %
> 10% fino a 20%	± 30 %
≤ 10%	± 50 %

⁵Nel caso del retinil eicosanoato come transizione *qualifier* era selezionata la 269/93 *m/z*, mentre la 269/199 non poteva essere utilizzata a causa della coeluizione con un interferente.

2.1.7 RIVELAZIONE UV-VISIBILE A SERIE DI DIODI (DAD)

Il rivelatore UV-vis a serie di diodi Series 200 Diode Array Detector II (Perkin Elmer, Norwalk, CT), dotato di una cella a flusso Z del volume di 4 μL con un cammino ottico di 2 mm, era accoppiato in serie tra la colonna cromatografica e lo spettrometro di massa.

Dai cromatogrammi LC-DAD di *vitamine liposolubili e carotenoidi*, acquisiti selezionando la lunghezza d'onda di 450 nm e una bandwidth di 10 nm, era possibile estrarre i corrispondenti spettri tra 250 e 700 nm, utili nell'identificazione dei carotenodi e dei loro isomeri geometrici nei diversi tipi di latte.

I programmi usati per la gestione dello strumento e l'acquisizione dei dati spettrali erano *Totalchrom Navigator* e *Iris*.

2.2 SVILUPPO DEL METODO PER VITAMINE LIPOSOLUBILI E CAROTENOIDI

2.2.1 STUDIO DELLA FRAMMENTAZIONE ED OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI IMPIEGATE IN MS/MS

Lo studio preliminare di frammentazione viene condotto con lo scopo di:

- i. individuare ioni frammento diagnostici utili a fini identificativi;
- ii. ottimizzare la trasmissione ionica per conseguire la massima sensibilità strumentale. A tale scopo i potenziali applicati ai vari componenti dell'ottica strumentale erano regolati per evitare o contenere la "frammentazione CID (*Collision Induced Decomposition*) in sorgente" (nota anche come "*up-front CID fragmentation*") ed ottenere la massima trasmissione dello ione precursore nella cella di collisione e quindi la massima sensibilità.

Lo studio di frammentazione delle vitamine liposolubili e dei carotenoidi selezionati è stato condotto mediante sorgente Turbo V dotata di probe APCI (temperatura del probe = 450 °C e corrente dell'ago = 3 μA), lavorando in FIA ed iniettando 1-10 ng di analita ad un flusso di 1 mL/min di fase mobile (100% metanolo).

a. **Vitamina A: retinolo**

Lo spettro full scan del *retinolo*, acquisito in *ionizzazione positiva* mediante **sorgente APCI**, evidenziava la presenza dello ione pseudomolecolare $[\text{M}+\text{H}]^+ = 287\text{ m/z}$ e dello ione $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+ = 269\text{ m/z}$ che risultava essere il picco base (rapporto intensità 7:1). Selezionando lo ione a 269 m/z

come precursore, per studiarne la frammentazione CID in modalità product ion scan (figura 26), si osservavano numerosi ioni prodotto, i più intensi dei quali erano rivelati a:

- ✓ 237 m/z , probabilmente per perdita di due gruppi metilici (-32 Da);
- ✓ 213 m/z , probabilmente per perdita di butene (-56 Da);
- ✓ 207 m/z , attribuibile al carbocatione dimetilcicloesendienico;
- ✓ 95 e 93 m/z , ascrivibili al carbocatione metilcicloeseno e al suo prodotto deidrogenato, rispettivamente.

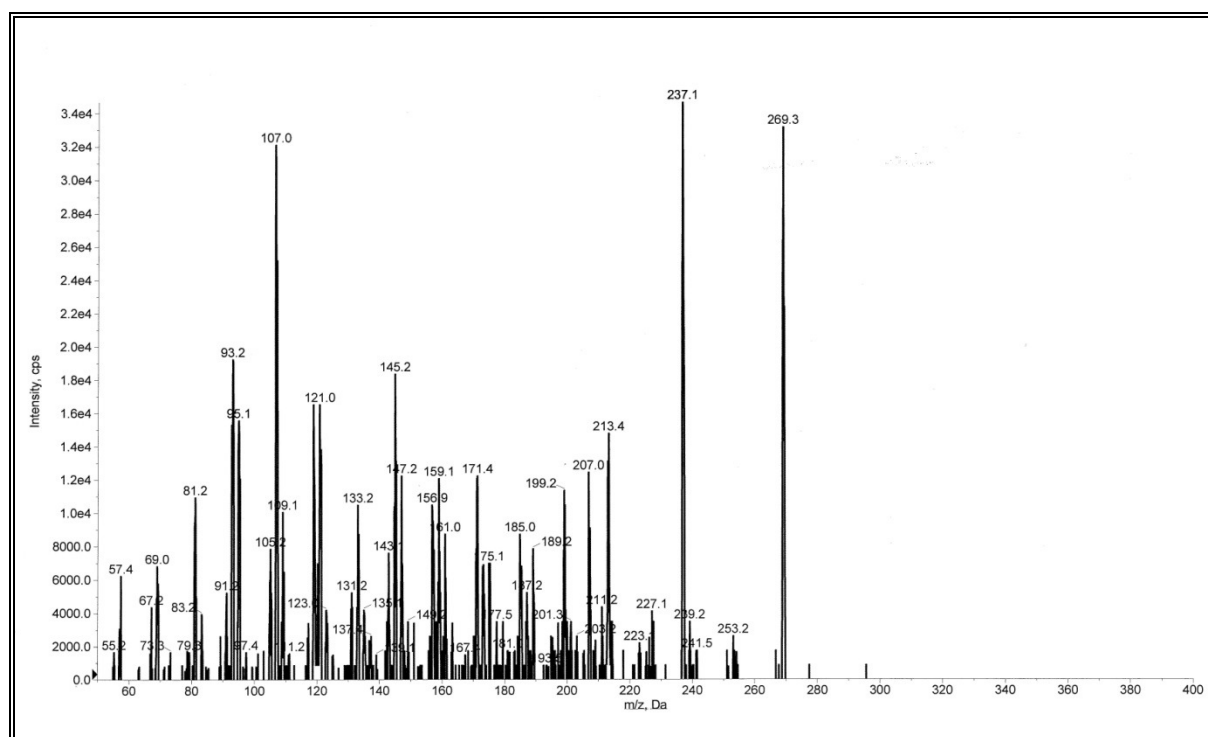


Figura 26: spettro di frammentazione dello ione $[MH-H_2O]^+$ a 269 m/z del retinolo, acquisito in ionizzazione positiva mediante sorgente APCI.

La stessa serie di ioni era osservata a seguito della frammentazione CID dello ione $[M+H]^+$ a 287 m/z , ma con intensità inferiore.

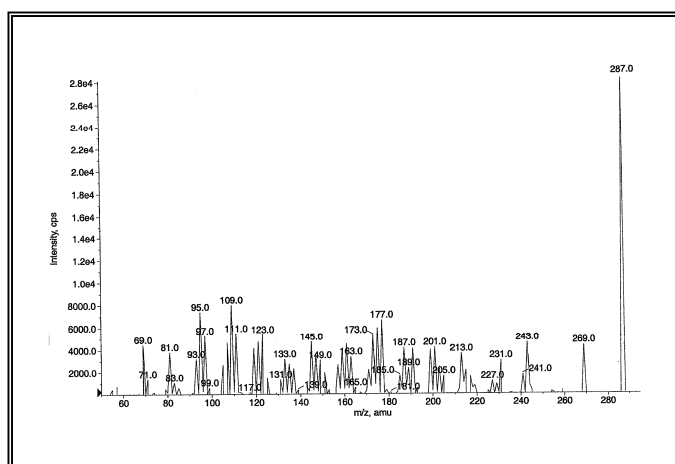


Figura 27: spettro di frammentazione dello ione $[M+H]^+$ a 287 m/z del retinolo, acquisito in ionizzazione positiva mediante sorgente APCI.

b. Vitamina E: α -, γ -, e δ -tocoferolo

Lo spettro **APCI** full scan, acquisito in *ionizzazione positiva*, evidenziava per tutti i vitameri la presenza delle seguenti specie:

- ✓ lo ione $[M-H]^+$, rilevabile con intensità significativa a 429 m/z solo per l' α -tocoferolo;
- ✓ il radical catione $[M]^+$, che risultava essere il picco base, a 430 m/z per l' α -tocoferolo, a 416 m/z per il γ -tocoferolo, e a 402 m/z per il δ -tocoferolo;
- ✓ lo ione pseudomolecolare $[M+H]^+$ a 431 m/z per l' α -tocoferolo, a 417 m/z per il γ -tocoferolo e a 403 m/z per il δ -tocoferolo.

I rapporti tra le intensità $[M-H]^+$: $[M]^+$: $[M+H]^+$ erano 0.25:1.00:0.43, ma risultavano alterati dalla distribuzione isotopica (in particolare picco A+1) della specie antecedente.

La frammentazione CID di $[MH]^+$, $[M]^+$ e $[M-H]^+$ causava:

- ✓ la rottura dell'anello cromanolico, generando un abbondante ione prodotto a 165, 151, e 137 m/z , rispettivamente per l' α -, il γ - e il δ -tocoferolo;
- ✓ la perdita dell'intera catena isoprenoide, originando uno ione a 205, 191 e 177 m/z rispettivamente per l' α -, il γ - e il δ -tocoferolo.

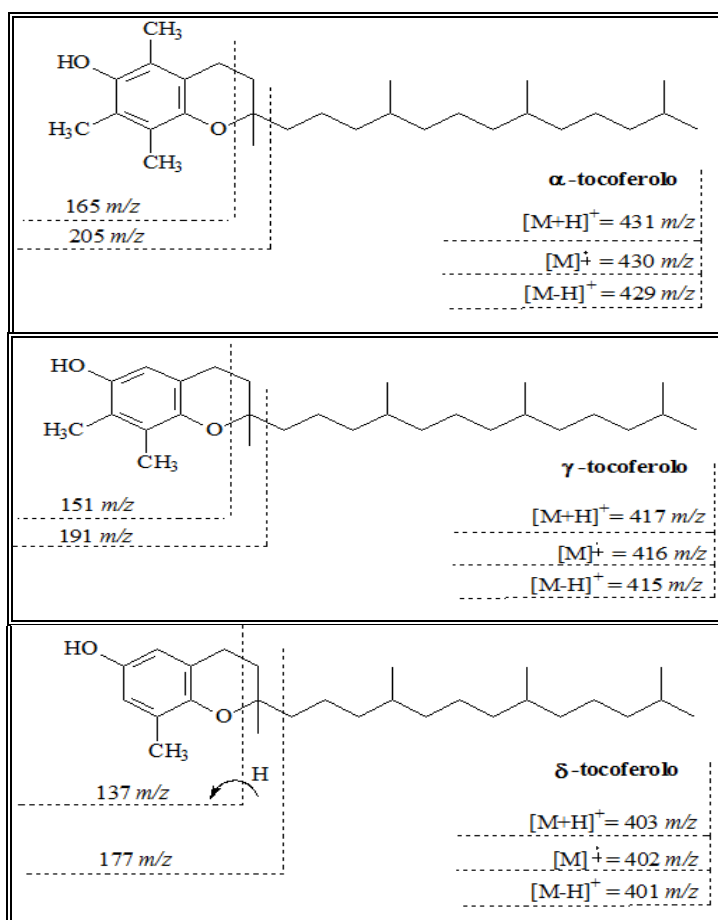


Figura 28: ioni prodotto comuni, generati dalla frammentazione CID delle tre specie ioniche $[M+H]^+$, $[M]^+$ e $[M-H]^+$ dei tocoferoli.

A causa della debole acidità dell'anello cromanolico, i tocoferoli potevano essere rivelati anche *in modalità negativa* con un segnale particolarmente intenso per lo ione pseudomolecolare $[M-H]^-$, osservato a 429, 415 e 401 m/z rispettivamente per l' α -, il γ - e il δ -tocoferolo. A seguito della frammentazione CID di questo ione si genera uno ione prodotto, particolarmente intenso, a 163, 149 e 135 m/z per l' α -, il γ - e il δ -tocoferolo, rispettivamente.

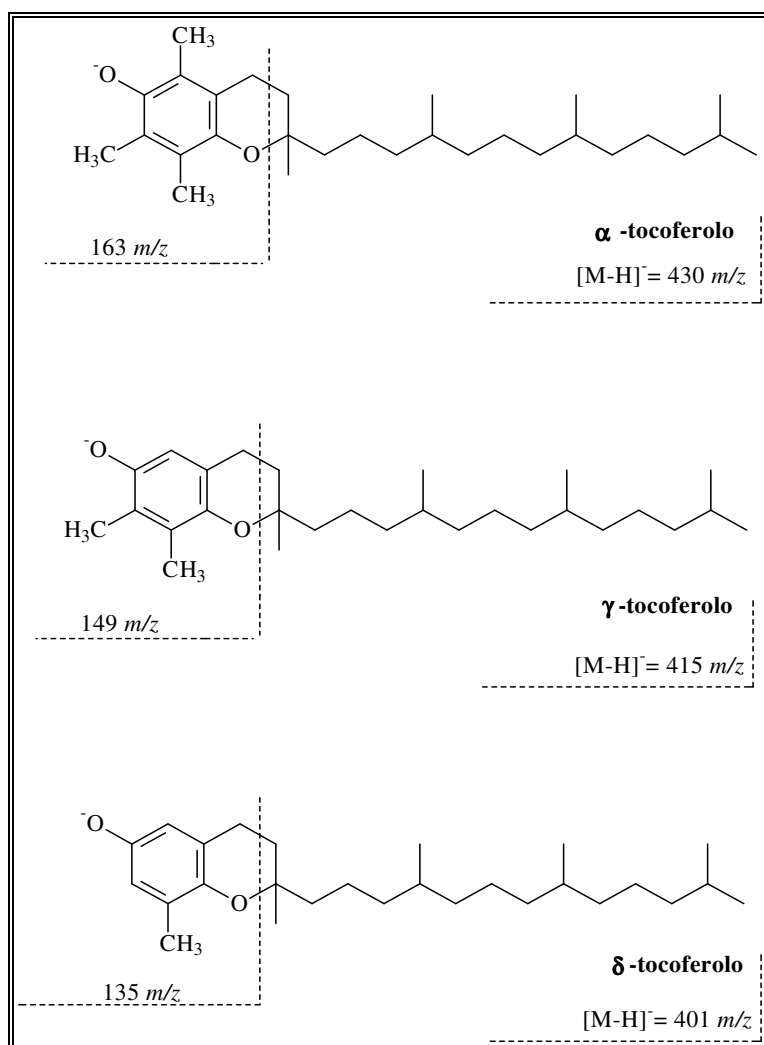


Figura 29: schema di frammentazione dello ione $[M-H]^-$ dei tocoferoli.

Altro ione, generato per perdita di un radicale metilico (-15 Da) dal precursore $[M-H]^-$, era osservato a 386 m/z per il γ -tocoferolo e a 400 m/z per il δ -tocoferolo.

c. **Vitamina D: ergocalciferolo (D2) e colecalciferolo (D3)**

Lo spettro **APCI** full scan, acquisito in *ionizzazione positiva* evidenziava la presenza delle seguenti specie:

- ✓ $[M]^{+}$ a 396 m/z per D2 e 384 m/z per D3;
- ✓ $[M+H]^+$ a 397 m/z per D2 e 385 m/z per D3, picco base per entrambi i vitameri;

✓ $[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]^+$ a 379 m/z per D2 e 367 m/z per D3.

I rapporti delle intensità degli ioni $[\text{M}+\text{H}]^+:[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]:[\text{M}]^+$ risultavano 1.00:0.78:0.44 per D2 e 1.00:0.95:0.60 per D3. Chiaramente, l'intensità del picco $[\text{M}+\text{H}]^+$ risultava alterata dal picco A+1 della specie $[\text{M}]^+$.

Selezionando lo ione pseudomolecolare $[\text{M}+\text{H}]^+$, come precursore per gli esperimenti MS/MS (figura 30), si confermava la generazione di uno ione frammento per perdita di una molecola di acqua, mentre per perdita della catena laterale satura si osservava lo ione a 259 m/z per la vitamina D₃; lo ione a 107 m/z si originava per scissione della catena insatura.

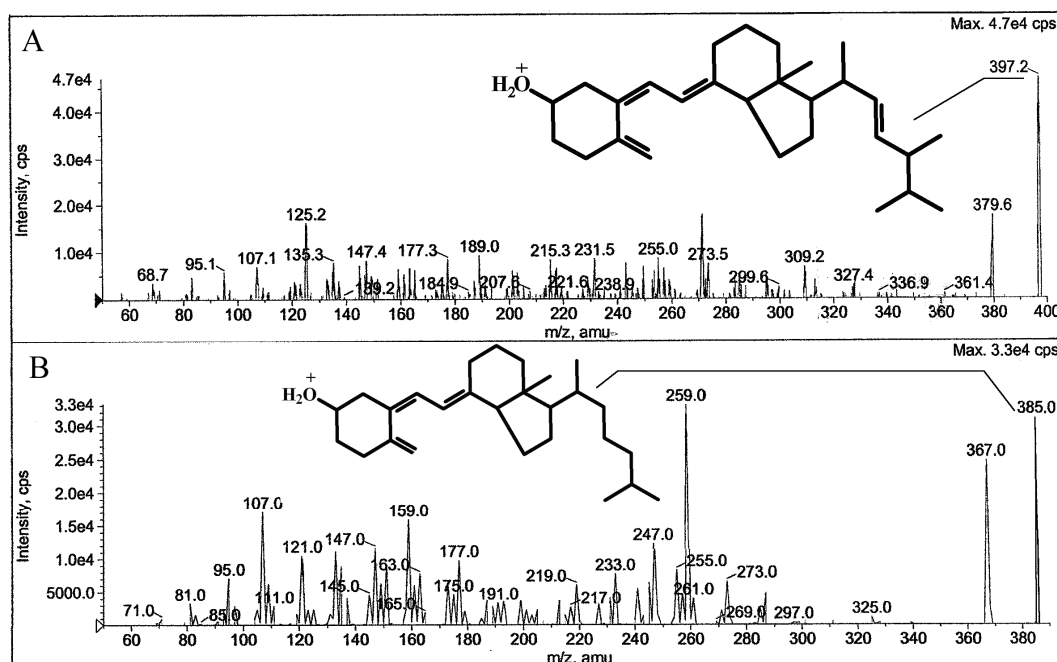


Figura 30: spettri di frammentazione dello ione $[\text{M}+\text{H}]^+$, generato per ionizzazione APCI dell'ergocalciferolo (A) e colecalciferolo (B).

d. Vitameri K: fillochinone (K1) e menachinone-4 (K2)

In *ionizzazione positiva*, lo spettro APCI full scan mostrava un intenso ione pseudomolecolare $[\text{M}+\text{H}]^+$ a 451 m/z per il fillochinone e a 445 m/z per il menachinone-4; i probabili siti di protonazione sono i due gruppi chetonici. Solo per il menachinone-4 si osservava anche lo ione $[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]^+$ a 427 m/z .

Gli addotti protonati di entrambi i vitameri K generavano un intenso ione a 187 m/z per perdita della catena laterale. Applicando energie di collisione progressivamente più elevate, il fillochinone frammentava producendo ioni prodotto scarsamente abbondanti (figura 31). Ioni frammento di intensità apprezzabile erano osservati per il menachinone-4 a 427 ($[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]^+$), 363, 341 e 149 m/z (figura 30).

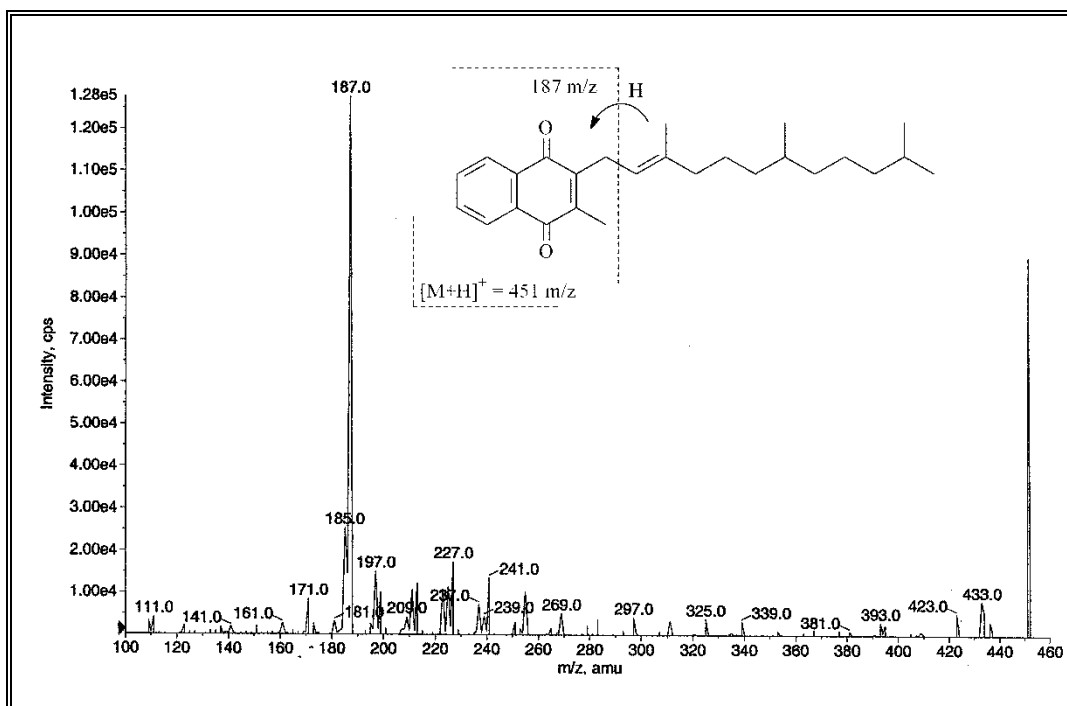


Figura 31: spettro di frammentazione dello ione $[M+H]^+$ a 451 m/z per la vitamina K1, acquisito in ionizzazione positiva mediante sorgente APCI.

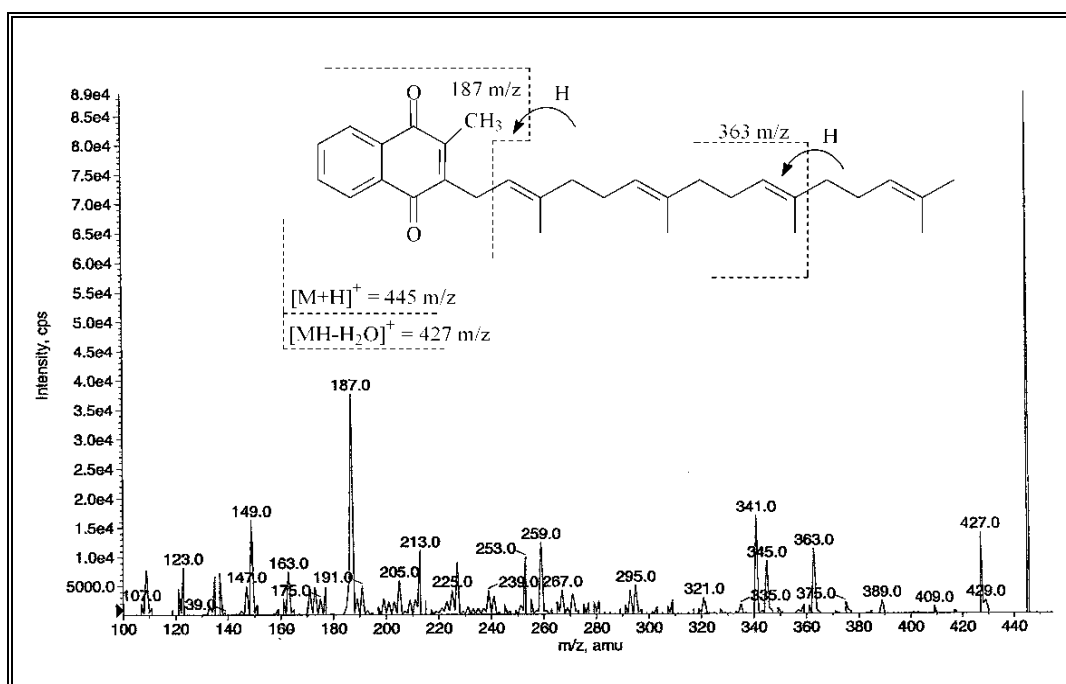


Figura 32: spettro di frammentazione dello ione $[M+H]^+$ a 445 m/z per la vitamina K2, acquisito in ionizzazione positiva mediante sorgente APCI.

In *ionizzazione negativa*, lo spettro **APCI** full scan rivelava la presenza di due specie:

- ✓ $[M]^-$, a 450 m/z per il fillochinone e a 444 m/z per il menachinone-4, che risultava picco base;
- ✓ $[M-H]^-$, a 449 m/z per il fillochinone e a 443 m/z , scarsamente intenso, per il menachinone-4.

Selezionando $[M]^{\bullet}$ come ione precursore per gli esperimenti MS/MS, entrambi i vitameri K generavano un intenso ione a $185\ m/z$ per scissione del legame C1'-C2' della catena laterale; un altro ione a $224\ m/z$ era prodotto dalla rottura del legame C3'-C4' del menachinone-4 (figura 32, pannelli A e B). Sotto condizioni CID, lo ione $[M-H]^{-}$ del fillochinone si comportava diversamente dal radical anione, producendo due intensi ioni frammento a $434\ m/z$, per perdita di un radicale metilico ($-15\ Da$), e a $219\ m/z$ (figura 32, pannello C).

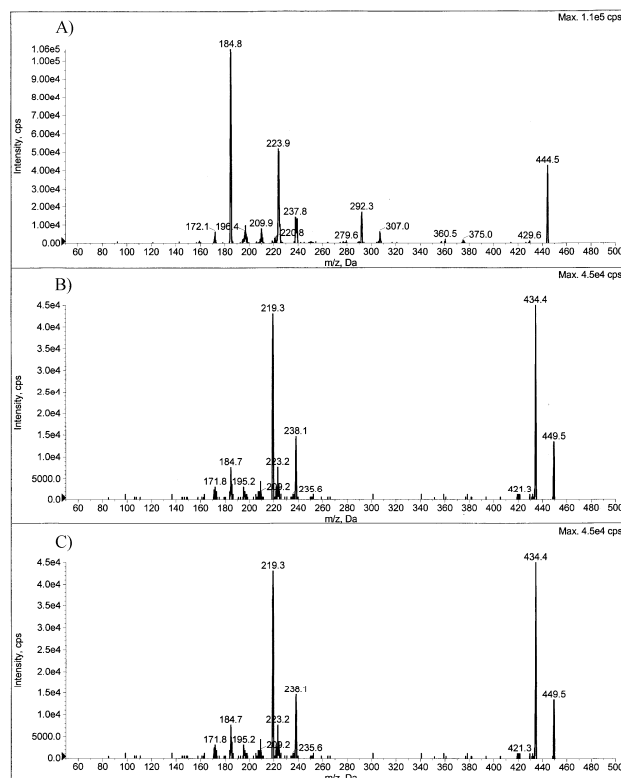


Figura 33: spettri di frammentazione dello ione $[M]^{\bullet}$ (pannello A per menachinone-4; pannello B per fillochinone) e dello ione $[M-H]^{-}$ (pannello C per fillochinone), acquisiti in ionizzazione negativa mediante sorgente APCI.

e. Carotenoidi: β -carotene

Sullo spettro APCI full scan del β -carotene si osservava un intenso ione $[M+H]^+$ a $537\ m/z$, e un debole segnale relativo al radical catione, a differenza di quanto riportato da van Breemen [103] in cui $[M]^{\bullet+}$ risultava essere picco base.

Lo spettro product ion scan del β -carotene produceva due serie di ioni frammento (figura 34). La prima serie era costituita dagli ioni a 137 , 177 , 203 , 243 , e $269\ m/z$, originata dalla rottura dei doppi legami C7-C8, C9-C10, C11-C12, C13-C14, e C15-C15', rispettivamente; lo ione più intenso a $177\ m/z$ era probabilmente stabilizzato dalla formazione di una struttura ad anello. La seconda serie

era generata dalla scissione dei singoli legami C6–C7 (frammenti a 123 o 413 m/z), C10–C11 (189 o 347 m/z), C12–C13 (321 m/z), C14–C15 (255 o 281 m/z).

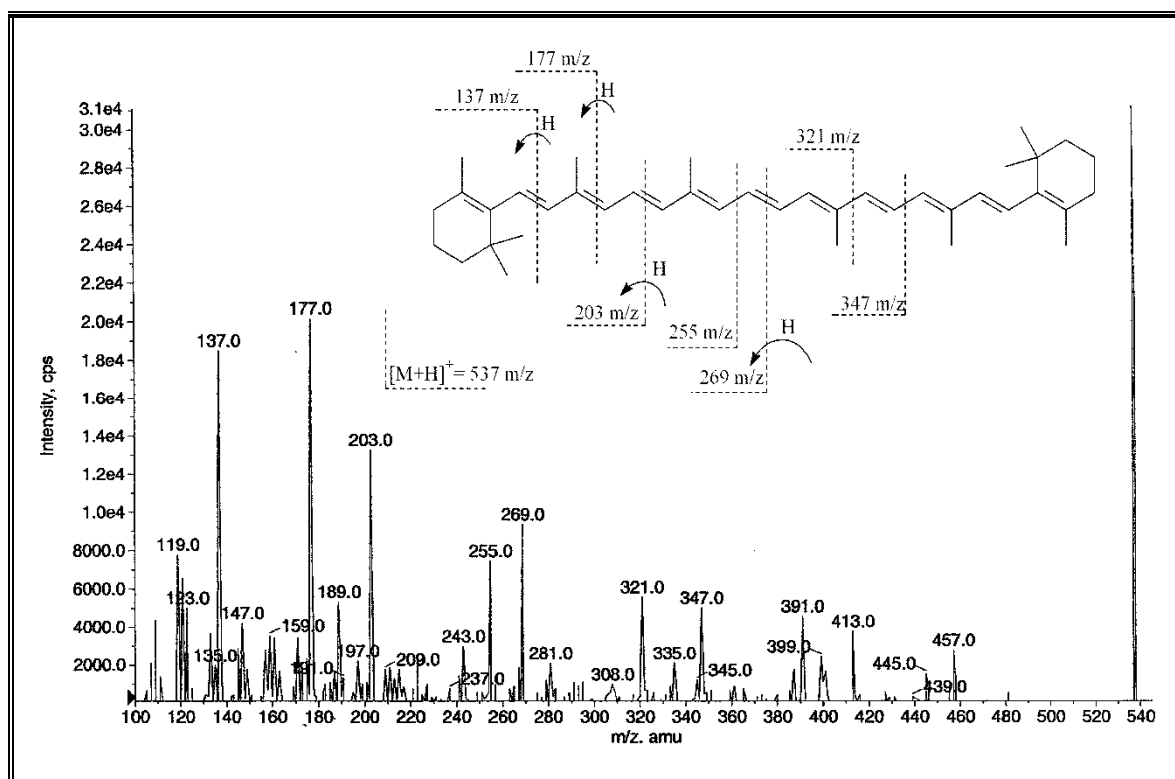


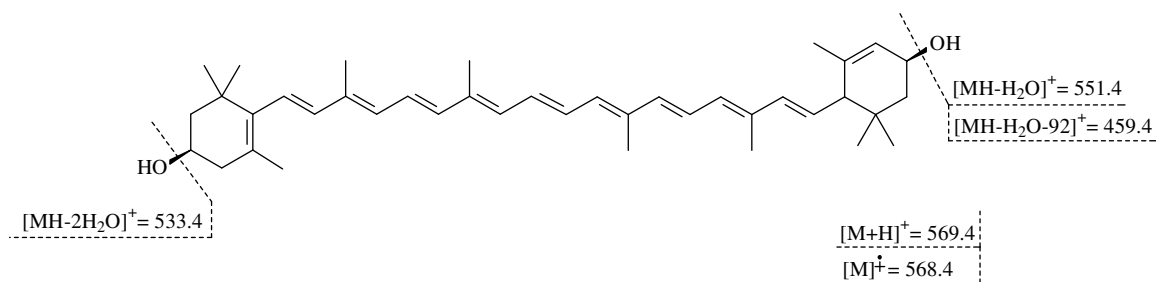
Figura 34: spettro di frammentazione dello ione $[M+H]^+$ del β -carotene, acquisito in ionizzazione positiva mediante sorgente APCI.

f. Xantofille: luteina, zeaxantina e β -criptoxantina

Le xantofille rispondevano in APCI *positiva* generando specie deidratate tipo $[MH-nH_2O]^+$, con n numero di gruppi ossidrilici presenti sulla molecola.

Sullo spettro APCI full scan della *luteina* era possibile osservare le seguenti specie:

- ✓ $[M+H]^+$ e $[M]^{++}$ rispettivamente a 569 e 568 m/z , scarsamente intesi;
- ✓ $[MH-H_2O]^+$ a 551 m/z , che risultava essere picco base;
- ✓ $[MH-92]^+$ e $[M-92]^{++}$ a 477 e 476 m/z , generati per perdita di toluene dagli ioni genitori corrispondenti;
- ✓ $[MH-2H_2O]^+$ a 533 m/z ;
- ✓ $[MH-H_2O-92]^+$ a 459 m/z , prodotto da $[MH-H_2O]^+$ per perdita di toluene.



I rapporti tra le intensità di $[M+H]^+:[M]^+:[MH-H_2O]^+:[MH-2H_2O]^+:[MH-H_2O-92]^+$ erano 0.11:0.09:1.00:0.20:0.28.

Per lo studio di frammentazione in modalità Product Ion Scan erano selezionati gli ioni $[M+H]^+$ a 569 m/z e $[MH-H_2O]^+$ a 551 m/z . Gli spettri di frammentazione risultavano essere simili, ma con intensità relative diverse e più intense per la frammentazione dello ione a 551 m/z , il cui spettro di frammentazione è mostrato in figura 35.

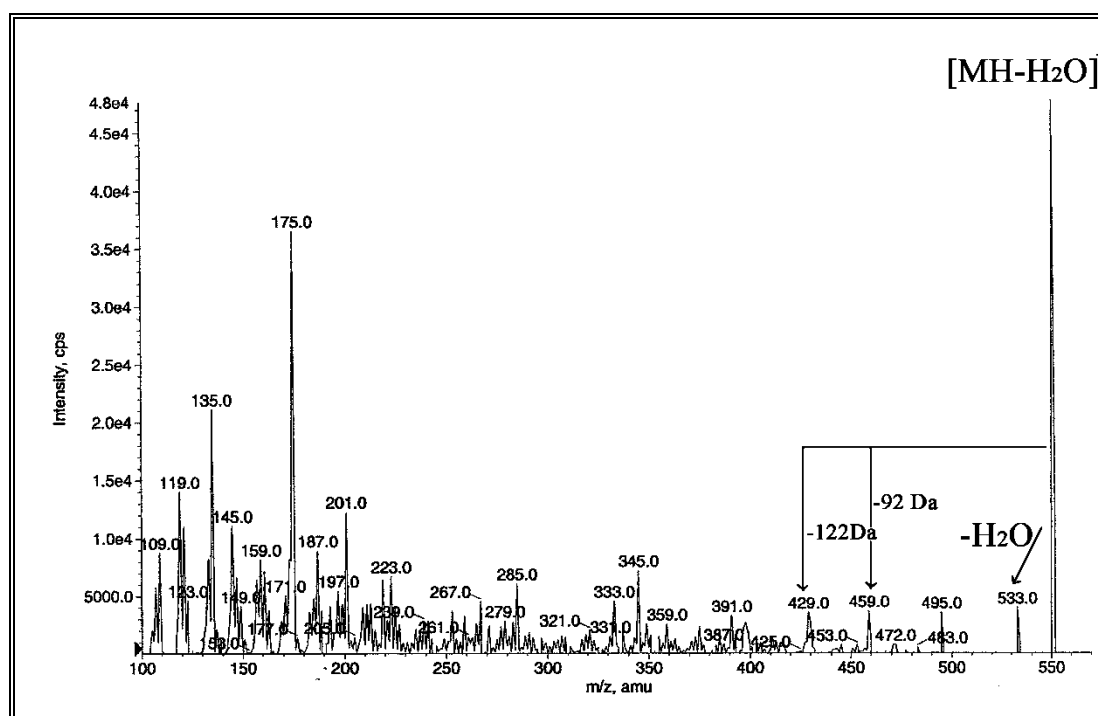


Figura 35: spettro di frammentazione dello ione $[MH-H_2O]^+$ a 551 m/z della luteina, acquisito in ionizzazione positiva mediante sorgente APCI.

Lo spettro **APCI** full scan della *zeaxantina* mostrava le stesse specie osservate per la xantofilla isomerica luteina, ma gli ioni $[M+H]^+$ a 569 m/z e $[MH-H_2O]^+$ a 551 m/z avevano abbondanze analoghe ($\sim 1:1$).

Per lo studio di frammentazione in modalità Product Ion Scan sono stati selezionati gli ioni $[M+H]^+$ a 569 m/z e $[MH-H_2O]^+$ a 551 m/z ; ioni frammento comuni risultavano il 119, il 135 e il 175 m/z , mentre differenze più marcate si osservavano tra 300 e 550 m/z . In questa regione, sullo spettro di

frammentazione di $[MH-H_2O]^+$ si osservava uno ione generato dalla perdita di una seconda molecola di acqua $[MH-2H_2O]^+$ ed uno generato dalla perdita dell'anello terminale (- 122 Da). Sullo spettro di frammentazione di $[M+H]^+$ erano rivelati alcuni picchi abbondanti e relativi alla perdita di acqua (551 m/z), alla perdita di toluene (477 m/z), alla perdita dell'anello finale (429 m/z) e alla scissione della molecola in due (285 m/z); spettro e schema di frammentazione di $[M+H]^+$ sono riportati in figura 36.

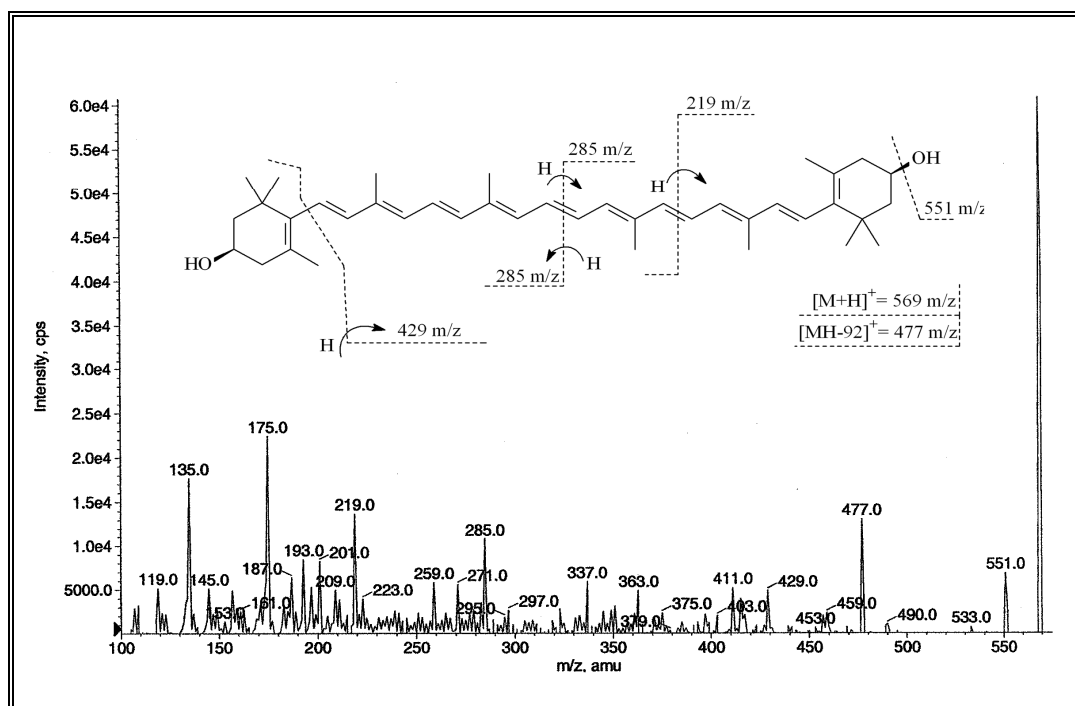


Figura 36: spettro di frammentazione dell'addotto protonico $[M+H]^+$ a 569 m/z della zeaxantina, acquisito mediante sorgente APCI.

Lo spettro APCI full scan della *β -criptoxantina* rivelava le seguenti specie:

- ✓ $[M+H]^+$ a 553 m/z , che risultava picco base;
- ✓ $[M]^{+\bullet}$ a 552 m/z ;
- ✓ $[MH-H_2O]^+$ a 535 m/z ;
- ✓ tre ioni a 461, 460, e 443 m/z generati per perdita di toluene dagli ioni genitori corrispondenti e attribuibili a $[MH-92]^+$, $[M-92]^+$ e $[MH-H_2O-92]^+$ a 477 e 476 m/z .

I rapporti tra le intensità di $[M+H]^+ : [M]^{+\bullet} : [MH-H_2O]^+ : [MH-92]^+ : [M-92]^+ : [MH-H_2O-92]^+$ erano 1.00: 0.56: 0.39: 0.47: 0.50: 0.14.

Per lo studio di frammentazione erano selezionate le specie più intense a 553 e 552 m/z . Lo spettro Product Ion Scan di $[M]^{+\bullet}$ mostrava un intenso ione $[M-92]^+$ e una serie di frammenti, dovuti ad una scissione della catena analoga a quella discussa per il β -carotene; lo spettro di $[M+H]^+$ era

analogo ma non si osservava, se non con scarsa intensità, lo ione $[MH-92]^+$. Gli ioni prodotto più intensi erano osservati a 107, 119, e 175 m/z .

2.2.2 IDENTIFICAZIONE DEI CAROTENOIDI MEDIANTE DIODE ARRAY DETECTOR (DAD)

Le *regole di Fieser* [104] (valide per polieni contenenti più di 4 doppi legami coniugati e riportate in tabella 22) sono state applicate per stimare la lunghezza d'onda corrispondente al massimo assoluto di assorbimento (λ_{max}) e l'assorbività molare corrispondente (ϵ_{max}) dei carotenodi presi in esame in questo studio.

Tabella 22: *regole di Fieser-Kuhn*

$$\lambda_{max} = 114 + 5 M + n (48 - 1.7n) - 16.5 R_{endo} - 10 R_{exo}$$

$$\epsilon_{max} = (1.74 \times 10^4) n$$

dove

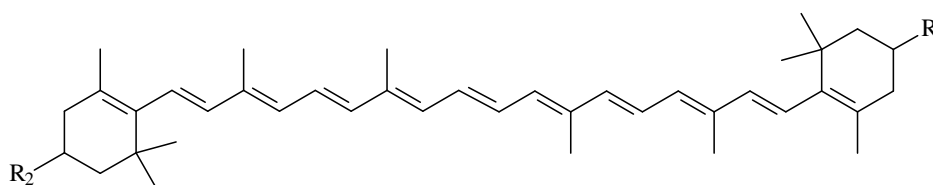
n = numero di doppi legami coniugati;

M = numero di sostituenti alchilici sul sistema coniugato;

R_{endo} = numero di anelli con doppi legami endociclici nel sistema coniugato;

R_{exo} = numero di anelli con doppi legami esociclici.

β -carotene, zeaxantina e β -criptoxantina



R_1 e R_2 = -H per β -carotene

R_1 = -H e R_2 = -OH per β -criptoxantina

R_1 e R_2 = -OH per zeaxantina

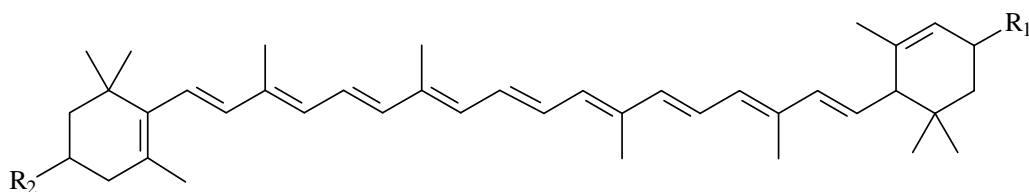
Il β -carotene ha 11 doppi legami coniugati, $n = 11$; $M = 10$ (6 metili sulla catena polienica e 4 sostituenti parte dei due anelli); $R_{exo} = 0$, ma $R_{endo} = 2$. Pertanto,

$$\lambda_{max} = 114 + (5 \times 10) + 11 [48 - (1.7 \times 11)] - (16.5 \times 2) = 453.3 \text{ nm}$$

$$\epsilon_{max} = [(1.74 \times 10^4) \times 11] = 19.1 \times 10^4$$

L'introduzione di gruppi ossidrilici non influenza il cromoforo e quindi, non ha effetto sullo spettro di assorbimento. Così, gli spettri UV-vis di β -criptoxantina e zeaxantina sono indistinguibili da quello del β -carotene.

α -carotene e luteina



R_1 e $R_2 = -H$ per α -carotene

R_1 e $R_2 = -OH$ per luteina

L' α -carotene e la luteina hanno 10 doppi legami coniugati, $n = 10$; $M = 8$ (5 metili sul sistema coniugato, 1 anello e 2 parti di anello); $R_{\text{exo}} = 0$; $R_{\text{endo}} = 1$. Pertanto,

$$\lambda_{\text{max}} = 114 + (5 \times 8) + 10 [48 - (1.7 \times 10)] - (16.5 \times 1) = 447.5 \text{ nm}$$

$$\epsilon_{\text{max}} = [(1.74 \times 10^4) \times 10] = 17.4 \times 10^4$$

I valori di λ_{max} , riportati in letteratura per uno stesso carotenoide, variano leggermente sia perché affetti da un errore di lettura ($\pm 1-2 \text{ nm}$) sia perché possono dipendere dal solvente utilizzato. I valori di λ_{max} dei carotenoidi in esano, etere di petrolio, dietilene, metanolo, etanolo e acetonitrile, sono praticamente gli stessi; più alti di 2-6 nm in acetone, di 10-20 nm in cloroformio e diclorometano, e di 18-24 nm in toluene.

La maggior parte dei carotenoidi mostra un caratteristico spettro di assorbimento a 3 picchi, con quello centrale avente più alta intensità (picco II). Per dare un'idea della struttura fine dello spettro, in taluni casi assieme alle λ_{max} viene riportato il rapporto percentuale (intensità picco III)/(intensità picco II) (rappresentabile come (III/II)%). Il (III/II)% è dato dal rapporto tra l'altezza del picco di assorbimento a λ più lunga, designato picco III, e di quella del picco di assorbimento centrale, designato picco II, prendendo il minimo tra i due picchi come linea di base, moltiplicato per 100 (figura 37).

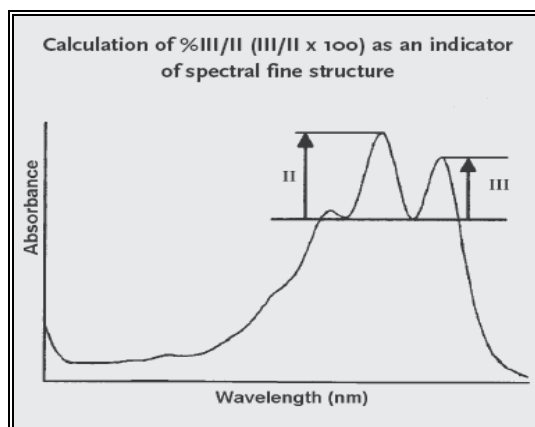


Figura 37: calcolo del rapporto (III/II)% come indicatore della struttura fine dello spettro UV-vis di un carotenoido.

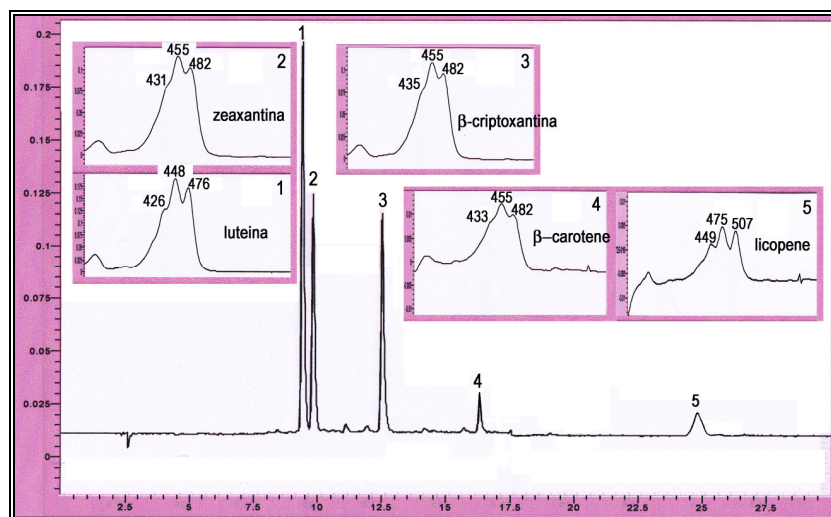


Figura 38: cromatogramma LC-DAD (450 nm) di una soluzione di carotenoidi (50 ng iniettati).

Gli spettri UV-vis dei carotenoidi (i quattro analiti target più il licopene, uno dei carotenoidi più diffusi in natura), riportati in figura 38, sono stati acquisiti tramite HPLC-DAD lavorando in gradiente, quindi variando la composizione della fase mobile nel tempo. Dal momento che i solventi utilizzati erano metanolo, isopropanolo ed esano, i valori di λ_{max} osservati erano molto vicini a quelli stimati teoricamente tramite le regole di Fieser. Nella tabella seguente si riportano i tre massimi di assorbimento con i rispettivi rapporti percentuali (III/II)%, osservati sperimentalmente nel nostro laboratorio e riportati in letteratura.

Tabella 23: λ dei tre picchi di assorbimento e rapporti (III/II)% per i carotenoidi selezionati.

Carotenoide	$(\lambda_{\max})_{\text{calc}}$ secondo Fieser-Kuhn	λ picco I	λ picco II $(\lambda_{\max})_{\text{obs}}$	λ picco III	(III/II)% osservati*	(III/II)% letteratura [34]
	nm					
β-carotene	453.3	433	455	482	30 ± 10	20
zeaxantina	453.3	431	455	482	41 ± 10	26
β-criptoxantina	453.3	435	455	482	27 ± 5	-
luteina	447.5	426	448	476	67 ± 3	53

* media e deviazione media, stimati su sei repliche.

Per l'identificazione degli isomeri geometrici è stata valutata la struttura fine degli spettri UV-vis. L'isomerizzazione *cis* di un doppio legame coniugato nella catena polienica causa un piccolo shift ipsocromico (usualmente da 2 a 6 nm per mono-*cis*; 10 nm per un di-*cis* e fino a 50 nm per un poli-*cis*), e un effetto ipocromico, accompagnato dalla comparsa di un “picco-*cis*” a circa 142 nm sotto la λ_{\max} del picco III (cioè quello a λ più lunga) del corrispondente carotenoide all-*trans* quando misurato in esano; il picco-*cis* appare dunque nella regione del vicino-UV (330-350 nm). L'intensità della banda-*cis* è più grande quando il doppio legame *cis* è più vicino al centro della molecola; se i caroteni mono-*cis* centrali hanno il picco-*cis* più alto rispetto agli isomeri mono-*cis* periferici, viceversa il loro assorbimento nella regione del visibile è meno intenso. Il carotene all-*trans* e i caroteni poli-*cis* sono più o meno piatti nella regione del picco-*cis*.

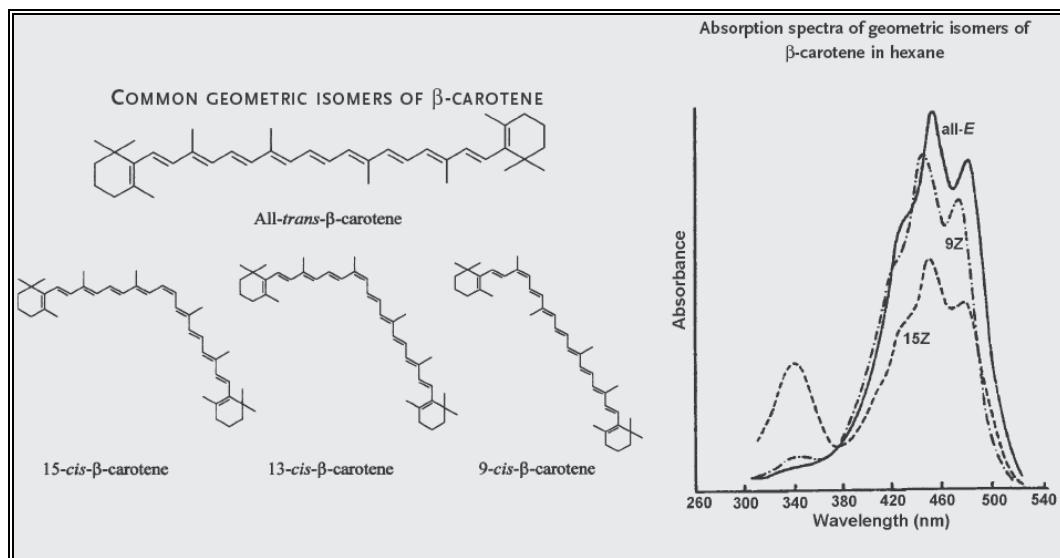


Figura 39: spettri UV-vis dei principali isomeri geometrici del β -carotene; il picco *cis*, intorno a 340 nm è particolarmente intenso per il 15-*cis*- β -carotene.

L'intensità relativa del picco-*cis* è espressa come rapporto tra l'intensità del picco-*cis* (A_B) e quella del picco centrale (A_{II}) moltiplicato per 100. Questo parametro è indicato come rapporto $Q = A_{II}/A_B$ %.

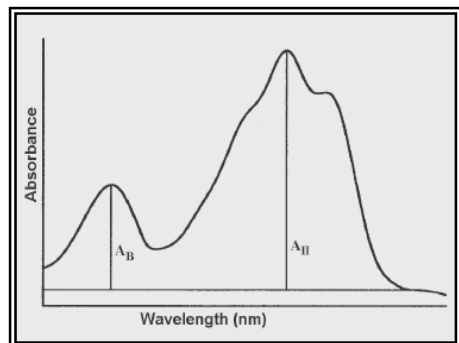


Figura 40: calcolo del $Q\text{-ratio} = (A_{II}/A_B)\%$ come indicatore della struttura fine dello spettro UV-vis di un carotenoide.

Tabella 24: dati UV-vis, riportati in letteratura [36], utili per l'identificazione dei principali isomeri geometrici del β -carotene.

Isomeri β -carotene	λ_{max} (nm)	cis peak (nm)	Q-ratio
All-trans	450	337	17.4
7-cis	446	337	16.1
9-cis	445	338	11.5
13-cis	442	336	2.8

2.2.3 OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI DI LAVORO DELLA SORGENTE APCI (ATMOSPHERIC PRESSURE CHEMICAL IONIZATION)

In figura 41 è schematizzata la sorgente Turbo V con probe APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) impiegata per la rivelazione, in ionizzazione positiva, delle vitamine liposolubili e dei carotenoidi selezionati per questo lavoro.

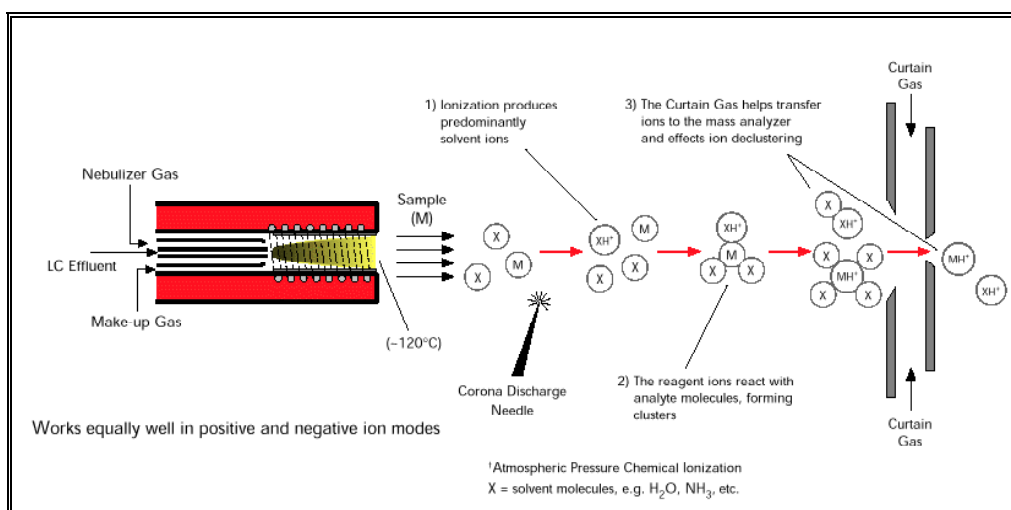


Figura 41: Sorgente APCI o Heated pneumatic nebulizer (HN). La ionizzazione viene innescata per impatto elettronico da una scarica di elettroni emessi da un ago: le prime molecole a ionizzarsi sono quelle del gas di nebulizzazione e di make-up (ioni primari del plasma), seguite da quelle della fase mobile (ioni secondari del plasma). Il gas reagente, nel suo complesso, ionizza le molecole di analita a seguito di reazioni acido-base.

L'ottimizzazione delle condizioni di lavoro per la sorgente APCI è stata eseguita effettuando diverse corse cromatografiche, secondo le relative specifiche precedentemente descritte nel paragrafo 2.1.5, iniettando 10 μL di una miscela degli analiti a due livelli di concentrazione:

✓ 2.5 ng/ μL per retinolo, ergocalciferolo, colecalciferolo, fillochinone, menachinone, β -carotene, α - e γ -tocoferolo;

✓ 5 ng/ μL per δ -tocoferolo, luteina, zeaxantina e β -cryptoxantina.

Alcune corse erano condotte per regolare la posizione del probe rispetto all'orifizio e per trovare il valore ottimale della pressione operativa del nebulizer gas e del curtain gas, mentre per il gas di make-up la pressione era regolata automaticamente dal software in funzione del valore impostato per il nebulizer gas. Il tutto al fine di incrementare il rapporto S/N, evitando il più possibile la contaminazione dello spettrometro.

I parametri critici per la ionizzazione APCI sono la corrente applicata all'ago (NC, needle current) e la temperatura della resistenza riscaldante il "nebulizzatore pneumatico". I risultati per i valori di NC testati (2, 3 e 4 μA), valutati in termini di S/N cromatografico (tabella 25), evidenziano che l'applicazione di una corrente di 3 μA consentiva di aumentare il rapporto S/N di circa 2 volte per tutti gli analiti. Allo stesso modo era ottimizzata la temperatura della resistenza del nebulizzatore, fondamentale per realizzare la completa evaporazione dell'effluente HPLC (solvente + analiti), prima di procedere alla ionizzazione chimica in fase gassosa. Dal momento che il gas reagente, costituito dal gas di nebulizzazione, dal gas di make-up e dai solventi della fase mobile, deve essere in forte eccesso rispetto all'analita, la sorgente APCI lavora con flussi elevati di fase mobile (1-2 mL/min). Le corse cromatografiche sono state realizzate a 400, 450 e 500 °C, temperature suggerite quando si opera con un flusso di 1 mL/min; per ogni valore di temperatura erano effettuate tre repliche. I risultati risultavano essere molto simili, con valori leggermente superiori a 450 °C.

Tabella 25: rapporti *S/N* medi relativi all'iniezione di 10 μL di una soluzione di lavoro (quantità iniettate tra 25 e 50 ng) applicando diversi valori di Needle Current nella sorgente APCI.

ANALITI	Transizione SRM Quantifier	NC=2 μA	NC=3 μA	NC=4 μA
		<i>S/N</i> *		
Retinolo	269/93	68	155	89
α -tocoferolo	430/165	80	129	72
δ -tocoferolo	402/177	19	42	30
γ -tocoferolo	416/151	89	169	111
Ergocalciferolo	385/259	520	884	720
Colecalciferolo	397/379	70	125	102
Filloquinone	451/187	1925	2339	1832
Menachinone-4	445/187	560	752	459
Luteina	551/175	17	43	13
Zeaxantina	551/135	15	35	18
β -criptoxantina	553/119	150	460	136
β -carotene	537/177	30	49	33

* media su tre repliche.

2.2.4 OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE E SELETTIVITÀ DEL METODO

Le condizioni cromatografiche definitive per separare i dodici composti con attività vitaminica ed antiossidante sono state definite a seguito di una serie di prove preliminari volte alla scelta della colonna cromatografica, della temperatura di termostatazione della stessa, della fase mobile, del gradiente di eluizione e della velocità di flusso.

Nelle fasi iniziali del lavoro, tutti gli analiti target erano separati su una colonna C_{30} [ProntoSIL C_{30} (3 μm , 250 mm x 4.6 mm I.D.)]. Questa fase stazionaria è particolarmente adatta alla separazione di isomeri idrofobici a lunga catena, come i carotenoidi o i vitameri di uno specifico gruppo vitaminico liposolubile. Le catene alchiliche lunghe 30 atomi di carbonio (derivatizzazione silice con triacontilsilano) sono rigide ed altamente ordinate, garantendo un'elevata selettività cromatografica. La casa produttrice assicura le migliori prestazioni, termostatando a temperatura ambiente o a temperature inferiori; infatti, a temperature elevate le catene C_{30} diventano meno ordinate e la forma del picco risulta distorta. La percentuale di acqua nella fase mobile dovrebbe essere inferiore al 20%, altrimenti la fase stazionaria è soggetta a collasso.

Allo scopo di verificare l'assenza d'interferenze dalla matrice, era condotto uno studio di selettività estraendo le correnti ioniche di ciascun composto dai cromatogrammi SRM dei campioni di latte analizzati. I criteri d'identificazione, ossia il matching del tempo di ritenzione e dell'abbondanza relativa con quella di uno standard autentico, erano verificati per tutti gli analiti, ad eccezione del menachinone-4 e del coilecalciferolo i cui rapporti ionici risultavano alterati. Allo scopo di verificare la coeluzione di composti interferenti isobarici responsabili per questa alterazione, era assemblato un sistema tandem di colonne C₁₈ (SupelcosilTM C₁₈ plus Alltima C₁₈; come descritto nel paragrafo 2.1.5) per migliorare l'efficienza cromatografica. In questo modo era possibile separare i picchi interferenti da quelli degli analiti ed ottenere rapporti ionici corretti (figura 42). La colonna C₃₀ doveva continuare ad essere utilizzata per la separazione dei carotenodi, risultando indispensabile per separare luteina e zeaxantina, isomeri strutturali indistinguibili per via mass-spettrometrica.

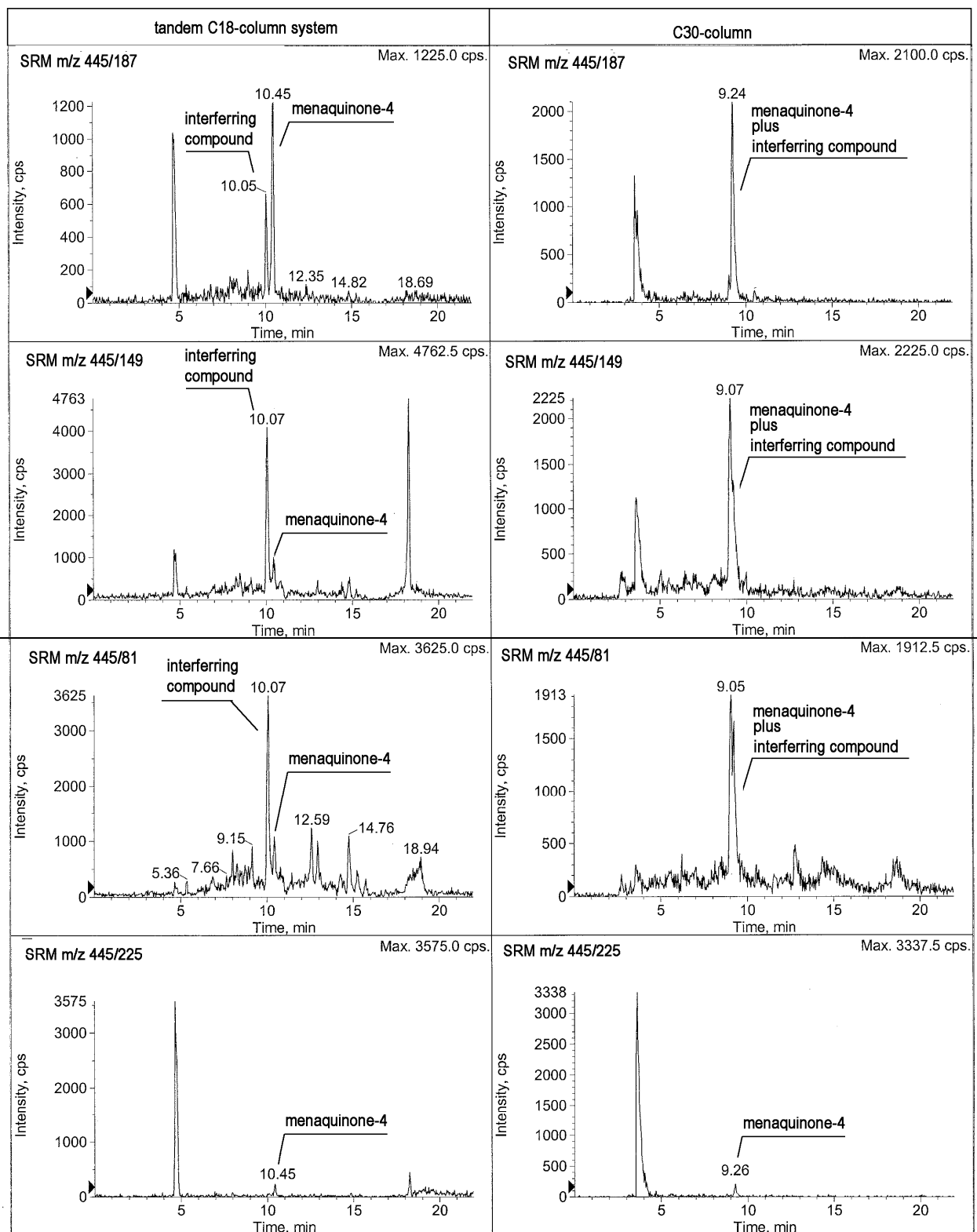


Figura 42: Profili LC-SRM del menachinone-4 estratto da un campione di latte di pecora. Rapporti ionici alterati erano osservati per gli analiti separate sulla colonna C_{30} ; in effetti, il sistema tandem di colonne C_{18} poteva separare un composto isobarico coeluyente. La sola transizione SRM “pulita” risultava essere la 445/225 m/z, ma era troppo poco intenso per poter rivelare questo analita nei tipi di latte in cui è meno abbondante.

2.2.5 OTTIMIZZAZIONE DELLA PROCEDURA ESTRATTIVA

La letteratura descrive procedure adatte all'isolamento individuale di ogni vitamina da un alimento o da un fluido biologico. In questo lavoro di tesi, le molteplici prove condotte avevano lo scopo di estendere tali metodiche all'estrazione simultanea dei dodici analiti selezionati dal latte delle diverse specie trattate.

La letteratura riporta la saponificazione a caldo (80 °C) come il metodo più utilizzato, con alcune varianti, per l'estrazione simultanea delle vitamine A, D, ed E da latte e latte fortificato [4, 5, 7, 49, 52, 55, 56]. Le drastiche condizioni di reazione sono responsabili della isomerizzazione termica della vitamina D a provitamina D, con perdite stimate attorno al 10-20%, e della degradazione delle xantofille e dei vitameri K.

Nelle fasi iniziali di questo lavoro, l'efficienza dell'estrazione diretta con solvente era verificata per isolare gli analiti più suscettibili agli alcali. Nonostante, le diverse prove di ottimizzazione, questa procedura poteva recuperare solo un numero limitato di vitamine e carotenoidi: retinolo, α -tocoferolo, γ -tocoferolo e menachinone-4. In particolare, fillochinone e carotenoidi restavano sequestrati nella frazione lipidica del latte, anche dopo il tentativo di distruggere i globuli lipoproteici e promuovere il rilascio degli analiti mediante sonicazione in presenza di etanolo ed esano.

A questo punto, la saponificazione a freddo era ottimizzata per realizzare l'estrazione simultanea delle vitamine liposolubili e dei carotenodi oggetto di questo studio.

La saponificazione è generalmente condotta con potassa alcolica al 50% (w/v) in presenza di un antiossidante. A causa delle difficoltà riscontrate nella solubilizzazione di KOH in etanolo, si preferiva preparare una soluzione di potassa al 50% (w/v) in acqua milliQ, come suggerito da alcuni autori [52]. Il primo step di ottimizzazione era stabilire il numero minimo di moli di KOH necessarie a idrolizzare i gliceridi nei diversi tipi di latte (vedi per il contenuto in grassi il paragrafo 1.2.1/b); la quantità di potassa richiesta era calcolata tenendo conto che 3 moli di KOH sono necessarie per idrolizzare una mole di trioleina, presa come molecola rappresentativa dei trigliceridi del latte (l'acido oleico è infatti l'acido grasso più abbondante del latte vaccino). Per esempio, 6 mL dei nostri campioni di latte vaccino (3,5% (w/v) di grassi) contengono 0.21 g di lipidi, corrispondenti a $2.37 \cdot 10^{-4}$ moli di trioleina = $7.1 \cdot 10^{-4}$ moli (80 μ L) di KOH al 50% (w/v). Il volume di potassa finale (e quindi il numero di moli) era scelto come miglior compromesso tra la quantità di analiti rilasciati dalla matrice grassa e l'estensione della degradazione dei vitameri K e delle xantofille. Dal momento che la percentuale media di grassi totali (comprendente cioè sia la frazione saponificabile che quella insaponificabile) era diversa da latte a latte, per ogni varietà di latte si eseguivano una serie di prove per stabilire il numero di moli di KOH idoneo. A tale scopo, si

prelevavano sei aliquote di latte da 6 mL ciascuna, deproteneizzando con 18 mL di etanolo allo 0.1% (w/v) BHT e usando i seguenti volumi (moli) di potassa acquosa al 50% (w/v): 100 μ L ($8.9 \cdot 10^{-4}$ moli), 500 μ L ($44.5 \cdot 10^{-4}$ moli), 1 mL ($89 \cdot 10^{-4}$ moli), 2 mL ($178 \cdot 10^{-4}$ moli), 3 mL ($267 \cdot 10^{-4}$ moli) e 4 mL ($356 \cdot 10^{-4}$ moli). Tre mL di potassa erano necessari per le varietà di latte più grasse (pecora, capra e bufala) e contenenti le concentrazioni più alte di retinolo e α -tocoferolo. Nonostante il latte asinino fosse quello meno grasso, era possibile utilizzare indistintamente da 1 a 3 mL di potassa, dal momento che risultava privo sia dei vitameri K che delle xantofille. Analogamente agli altri tipi di latte, 3 mL erano soddisfacenti anche per estrarre la maggior parte degli analiti dal latte vaccino, ma degradavano significativamente vitameri K e xantofille. Pertanto, per i campioni di latte di asina e di mucca si sceglieva di utilizzare 1 mL di KOH al 50% (w/v).

Tabella 26: risultati delle prove di saponificazione a freddo del latte vaccino, condotta con diverse quantità di una soluzione acquosa di KOH 50%(w/v).

Analiti rivelati	Transizioni SMR più intensa	Area (10^3 counts x s)					
		100 μ L KOH 50% (w/v)	500 μ L KOH 50% (w/v)	1 mL KOH 50% (w/v)	2 mL KOH 50% (w/v)	3 mL KOH 50% (w/v)	4 mL KOH 50% (w/v)
retinolo	269/93	2425	5271	15035	36538	35562	32029
γ -tocoferolo	416/151	90	549	391	407	356	230
α -tocoferolo	430/165	6018	9366	17500	14079	12956	12179
luteina	551/175	4,5	11	38	6.3	6.4	6.0
menachinone	445/149	68	64	19	53	55	55
fillochinone	451/187	52	41	-	30	29	29
β -criptoxantina	553/119	-	4,8	19	3.0	3.1	3.1
β -carotene	537/177	-	-	8	58	76	92

Gli altri fattori che sono stati ottimizzati erano: il volume del campione, il rapporto tra i volumi di campione ed etanolo, essenziale per una precipitazione proteica quantitativa, e il volume di esano, fondamentale per ottenere la migliore efficienza estrattiva. Il volume di acqua milliQ, aggiunta dopo la saponificazione a freddo e prima dell'estrazione con esano, era indispensabile per migliorare la separazione di fase e portare la percentuale di etanolo sotto il 40%, evitando così perdite a carico degli analiti più polari quali retinolo e tocoferolo; addizionando 8.5 mL di acqua, la percentuale di etanolo scendeva al 37% (v/v).

Per valutare il numero di frazioni di esano da 12 mL ciascuna da utilizzare nell'estrazione liquido-liquido del digerito, 6 mL di latte crudo erano estratte per 5 volte al termine della saponificazione;

le cinque frazioni di esano erano lavate separatamente 2 volte con 6 mL di H₂O milliQ, evaporati a 100 μ L a 30 °C sotto N₂ e diluiti 1:2 con 100 μ L di una soluzione isopropanolo:esano (75:25, v/v) allo 0.1% (w/v) in BHT. Venti μ L di ciascuna frazione erano iniettati nel sistema HPLC-MS/MS. I risultati, riportati in tabella 27, indicano la necessità di effettuare per i diversi tipi di latte differenti estrazioni ed in particolare: due estrazioni per il latte di mucca e asina, tre per il latte di bufala e quattro per quello di capra e pecora.

Con questa procedura, assieme ai carotenoidi e alle vitamine liposolubili erano inevitabilmente coestratti gli steroli, costituenti la frazione insaponificabile; tuttavia, gli estratti finali, di colore giallo intenso, risultavano essere limpidi. Gli acidi grassi, precipitati come sali (saponi), e il glicerolo non erano coestratti sotto queste condizioni.

Tabella 27: risultati della saponificazione a freddo, condotta con diverse frazioni di esano (12 mL ciascuna), per i diversi tipi di latte studiati in questo lavoro. I risultati sono espressi come valor medio di tre repliche.

Latte	Analiti	Transizioni SMR più intensa	A (10 ³ counts x s)		
			Frazione I+II esano	Frazione III esano	Frazione IV esano
mucca	Retinolo	269/93	15035	516	90
	γ -tocoferolo	416/151	391	40	4
	α -tocoferolo	430/165	17500	236	46
	Luteina	551/175	38	6	3.2
	Zeaxantina	551/135	-	-	-
	Menachinone-4	445/149	19	-	-
	Filloquinone	451/187	-	-	-
	β -criptoxantina	553/119	19	1.2	-
	β -carotene	537/177	8	-	-
bufala	Retinolo	269/93	57760	14130	7484
	γ -tocoferolo	416/151	4649	1181	680
	α -tocoferolo	430/165	8891	21385	122
	Luteina	551/175	-	-	-
	Zeaxantina	551/135	-	-	-
	Menachinone-4	445/149	6.86	55.5	-
	Filloquinone	451/187	5.10	108	-
	β -criptoxantina	553/119	-	-	-
	β -carotene	537/177	-	-	-
pecora	Retinolo	269/93	98926	28672	14007
	γ -tocoferolo	416/151	2184	747	545
	α -tocoferolo	430/165	85864	5696	1726
	Luteina	551/175	90,81	-	-
	Zeaxantina	551/135	5.6	-	-
	Menachinone-4	445/149	-	-	-
	Filloquinone	451/187	147.2	6.6	3.6
	β -criptoxantina	553/119	-	-	-
	β -carotene	537/177	11,73	-	-

Latte	Analiti	Transizioni SMR più intensa	A (10 ³ counts x s)		
			Frazione I+II esano	Frazione III esano	Frazione IV esano
capra	Retinolo	269/93	70954	20000	14000
	γ-tocoferolo	416/151	5069	960	645
	α-tocoferolo	430/165	138930	7855	1897
	Luteina	551/175	35	-	-
	Zeaxantina	551/135	6,4	-	-
	Menachinone-4	445/149	92.51	6.32	-
	Filloquinone	451/187	93	3.3	-
	β-criptoxantina	553/119	-	-	-
	β-carotene	537/177	-	-	-
asina	Retinolo	269/93	998	66	-
	γ-tocoferolo	416/151	14	-	-
	α-tocoferolo	430/165	610	32	-
	Luteina	551/175	-	-	-
	Zeaxantina	551/135	-	-	-
	Menachinone-4	445/149	-	-	-
	Filloquinone	451/187	-	-	-
	β-criptoxantina	553/119	-	-	-
	β-carotene	537/177	-	-	-

2.3 SVILUPPO DEL METODO PER I RETINIL ESTERI

2.3.1 STUDIO DELLA FRAMMENTAZIONE ED OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI IMPIEGATE IN MS/MS

Lo studio di frammentazione dei retinil esteri selezionati è stato condotto mediante sorgente *Turbo V* dotata di probe APCI (temperatura del probe = 450 °C e corrente dell'ago = 3 μA), lavorando in Flow Injection Analysis (FIA) ed iniettando 1-20 ng di analita ad un flusso di 1 mL/min di fase mobile (100% metanolo).

Per lo studio di frammentazione del *retinolo* si rimanda al paragrafo 2.2.1.

Per i *retinil esteri*, come già descritto nel paragrafo 2.1.6, lo studio di ionizzazione e frammentazione ne delineava un comportamento analogo in sorgente APCI: idrolisi del legame estereo e deidratazione del retinolo dovuta all'elevata temperatura operativa della sorgente, caratteristica già riportata in alcuni studi [84, 101].

In generale, lo spettro full scan di ciascun retinil estere, acquisito in *ionizzazione positiva* tramite sorgente APCI, evidenziava la presenza delle seguenti specie:

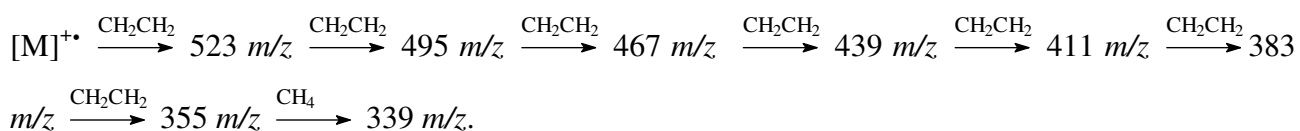
- lo ione pseudomolecolare [M+H]⁺;

- il radical catione $[M]^+$ (assente per retinil palmitato);
- lo ione $[M-H]^+$;
- lo ione $[\text{retinolo}+H-H_2O]^+$ a 269 m/z .

Il deidroretinolo risultava in tutti i casi la specie ionica più intensa.

Per quel che riguarda le tre specie direttamente correlabili al rapporto m/z di ciascun retinil estere, l'intensità della specie radicalica $[M]^+$ risultava, nella maggior parte dei casi (retinil propionato, caprato, miristato, pentadecanoato, eptadecanoato, eicosanoato, palmitoleato, linolenato, oleato e arachidonato), superiore sia rispetto a quella dell'addotto protonico $[M+H]^+$, che a quella della specie $[M-H]^+$, rivelabile tra l'altro solo per alcuni dei composti in studio (retinil propionato, caprilato, miristato, pentadecanoato, stearato e oleato); solo per il retinil laurato la specie più intensa era lo ione $[M-H]^+$.

Sullo spettro full scan era possibile osservare anche una serie di ioni generati dalla frammentazione della catena laterale. Emblematico è l'esempio del retinil stearato, la cui catena perde sistematicamente 28 u ($-CH_2CH_2$) producendo i seguenti ioni frammento:



Lo ione a 339 m/z era osservato per tutti i retinil esteri con particolare intensità; 411 e 383 m/z erano altri frammenti rivelati in molti casi.

Questo comportamento potrebbe essere ascrivibile ad un tipo di decomposizione nota come “*frammentazione a carica remota*” [105], cosiddetta perché la reazione di rottura del legame prende luogo in un sito lontano da quello di carica, che non viene coinvolto nel meccanismo di frammentazione. Le reazioni di rottura cioè non sono “mediate dalla carica” e coinvolgono la perdita di specie neutre come C_nH_{2n+2} , C_nH_{2n+1} , C_nH_{2n} , H_2O ed altre specie neutre da punti della molecola ionizzata che sono spazialmente separati dal sito di carica da molti atomi. Il solo requisito strutturale per indurre frammentazioni a carica remota è che il sito di carica sia stabile così da non migrare o essere coinvolto nella porzione che frammenta. Le frammentazioni a carica remota di ioni che contengono un sito di carica stabile sono analoghe, da un punto di vista meccanicistico, alle decomposizioni termiche in fase gassosa di molecole neutre; l'elevata temperatura della sorgente APCI, così come l'elevata pressione (attivazione collisionale), potrebbe generare questo tipo di frammentazione che non è osservata in cella di collisione.

In figura 43 riportiamo gli spettri full scan di: retinil caprilato (A), retinil palmitoleato (B) e retinil miristato (C).

Selezionando lo ione $[\text{retinolo}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ a $269\ m/z$ come precursore, per studiarne la frammentazione CID in modalità product ion scan, esso forniva lo stesso pattern di frammentazione del retinolo; si osservavano quindi numerosi ioni prodotto, i più intensi dei quali erano rivelati a: 213, 199, 121, 119, 107, 95 e $93\ m/z$.

Anche le specie $[\text{M}]^+$ e $[\text{M}+\text{H}]^+$ davano luogo ad una frammentazione CID simile: nel primo caso ioni prodotto intensi erano osservabili a $268\ m/z$, $[\text{retinolo}-\text{H}_2\text{O}]^{++}$, e a 253, 175 e $145\ m/z$, nel secondo invece soltanto lo ione prodotto a $269\ m/z$, $[\text{retinolo}+\text{H}+\text{H}_2\text{O}]^+$, era generato con intensità significativa.

In figura 44 riportiamo lo spettro di frammentazione dello ione pseudomolecolare $[\text{M}+\text{H}]^+$ del retinil palmitoleato (A) e dello ione molecolare $[\text{M}]^{++}$ del retinil caprato (B).

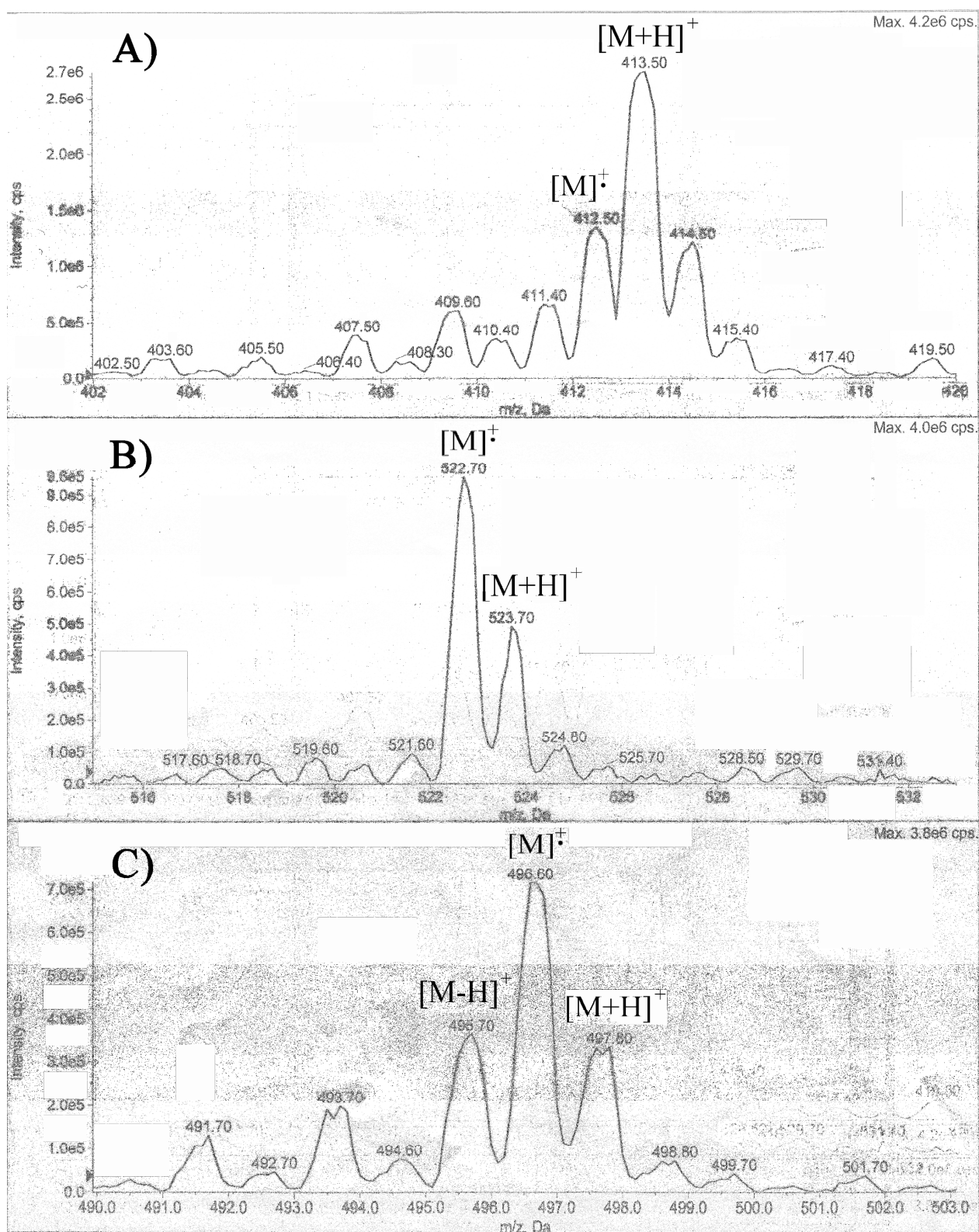


Figura 43: spettri Full scan in ionizzazione APCI di: (A) retinil caprilato, per il quale la specie ionica più intensa era l'addotto protonico $[M+H]^+ = 413$ m/z; (B) retinil palmitoleato, per cui invece il radical catione $[M]^{\bullet+}$ aveva un'intensità superiore ed il retinil miristato (C), per il quale era anche ben visibile la specie ionica $[M-H]^+$.

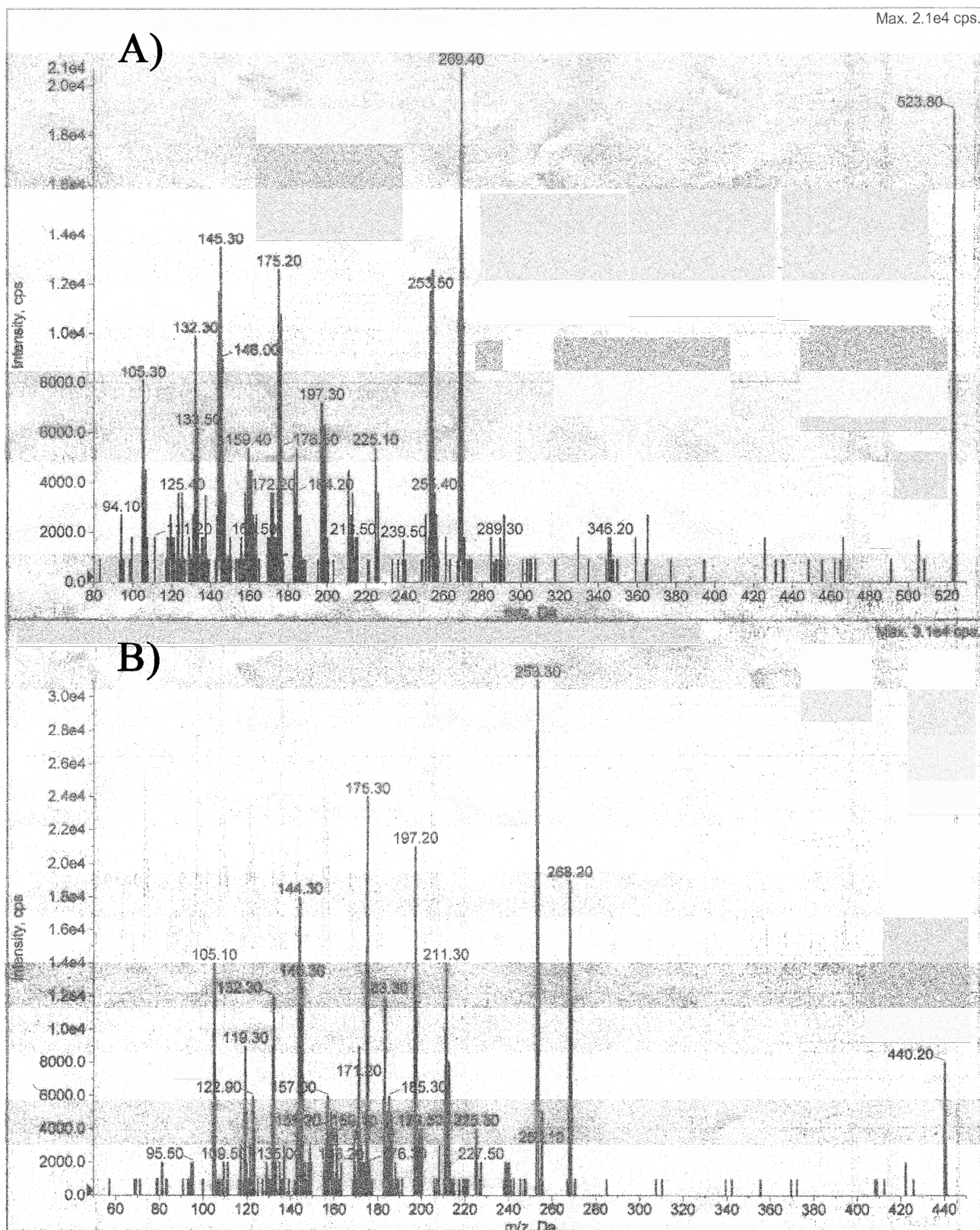


Figura 44: spettri di frammentazione APCI delle specie ioniche (A) $[M+H]^+$ per il retinil palmitoleato e (B) $[M]^+$ per il retinil caprato, generate in sorgente e selezionate come ioni precursori per gli esperimenti MS/MS.

Utilizzando campioni di controllo, sulla base del miglior rapporto segnale/rumore cromatografico e della minore interferenza della matrice, sono state selezionate due transizioni SRM 269/ione frammento m/z per ogni retinil estere.

2.3.2 OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI DI LAVORO DELLA SORGENTE APCI

L'ottimizzazione delle condizioni di lavoro per la sorgente APCI è stata eseguita effettuando diverse corse cromatografiche, secondo le relative specifiche precedentemente descritte nel paragrafo 2.1.5, iniettando 20 μL di una miscela degli analiti alla concentrazione di 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Come nel caso delle vitamine liposolubili e dei carotenoidi, le corse erano condotte al fine di incrementare il rapporto S/N, sia ottimizzando la posizione del probe rispetto all'orifizio sia selezionando il valore ottimale della pressione operativa del *nebulizer* gas e del *curtain* gas, mentre per il gas di *make-up* la pressione era regolata automaticamente dal software in funzione del valore impostato per il *nebulizer* gas.

Per la valutazione dei parametri critici per la ionizzazione APCI, ovvero la corrente applicata all'ago (NC) e la temperatura della resistenza riscaldante il "nebulizzatore pneumatico", si sono testati valori di NC pari a 2, 3 e 4 μA e temperature della resistenza di 400, 450 e 500 °C.

I risultati per i valori di NC testati, valutati in termini di S/N cromatografico, evidenziavano che l'applicazione di una corrente di 3 μA consentiva di aumentare il rapporto S/N di circa 2 volte rispetto alle altre condizioni.

Per ogni valore di temperatura testata erano effettuate tre repliche. La temperatura ottimale sperimentata risultava essere pari a 450 °C (tabella 28).

Tabella 28: rapporti S/N medi relativi all'iniezione di 20 μL di una soluzione di lavoro (20 ng iniettati), applicando diversi valori di temperatura della sorgente APCI. La cromatografia era realizzata sul sistema tandem TSKgel Super-ODS+Prontosil C₃₀ secondo le condizioni descritte nel paragrafo 2.1.5.

ANALITI	Transizione SRM Quantifier	T=400°C	T=450°C	T=500°C
		S/N*		
Retinolo	269/119	603	715	790
Retinil caprilato	269/119	301	365	269
Retinil caprato	269/199	107	150	93
Retinil laurato	269/119	32	40	26
Retinil linolenato	269/199	99	138	70
Retinil palmitoleato	269/199	86	123	75
Retinil miristato	269/119	41	60	44
Retinil linoleato	269/199	393	539	436
Retinil pentadecanoato	269/119	29	42	26
Retinil oleato	269/119	74	95	59
Retinil palmitato	269/119	68	92	61
Retinil eptadecanoato	269/199	43	62	52
Retinil stearato	269/119	639	761	701
Retinil eicosanoato	269/119	59	76	42

* media su tre repliche.

2.3.3 OTTIMIZZAZIONE DELLE CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE

Le condizioni cromatografiche per separare i sedici retinoidi, quattordicici analiti più due standard interni, sono state definite a seguito di una serie di prove preliminari volte alla scelta della colonna cromatografica, del gradiente di eluizione e della velocità di flusso. Tutte le prove sono state condotte con l'ausilio della sorgente APCI, in modalità di ionizzazione positiva, iniettando 20 μL di una soluzione di lavoro degli analiti selezionati alla concentrazione di 1 ng/ μL (20 ng iniettati).

Come descritto nel paragrafo 2.1.5, nel caso del retinolo e dei retinil esteri, le transizioni SRM selezionate erano caratteristiche della classe di composti e non dei singoli analiti. Risultava dunque necessario arrivare ad una completa separazione di queste sostanze, problema di non facile risoluzione dato che esse differiscono soltanto per la lunghezza della catena dell'acido grasso e per il numero dei doppi legami. A tal fine, sono state testate diverse colonne cromatografiche normal-bore a fase inversa:

- *Prontosil C₃₀* (4.6 x 250 mm; 3 μm): si tratta di una colonna particolarmente adatta per la separazione di composti idrofobici a lunga catena, come descritto nel paragrafo 2.2.4.
- *TSKgel Super-ODS* (4.6 x 100 mm; 2 μm), colonna impaccata con particelle sferiche monodisperse di silice del diametro medio di 2.3 μm legate covalentemente a catene alchiliche C₁₈. Il piccolo diametro delle particelle rende conto dell'elevata efficienza, mentre l'impaccamento monodisperso genera contropressioni operative tipiche di particelle con diametri superiori, consentendo l'uso di flussi più elevati rispetto a quelli utilizzabili per impaccamenti < 2 μm .
- *Phenomenex ODS30* (4.6 x 150 mm; 5 μm) con una fase stazionaria, sempre costituita da silice derivatizzata con catene alchiliche C₁₈, ma con un carico di carbonio superiore a quello di una C₁₈ normale (fino al 31%).
- *Alltima C₁₈* (4.6 x 250 mm; 5 μm). È una colonna altamente disattivata (*polimerically bonded and double encapped*), che assicura una buona forma del picco, un'elevata selettività ed efficienza cromatografica.

La definizione delle condizioni cromatografiche ha richiesto numerose prove, realizzate sia utilizzando una singola colonna che accoppiamenti in serie di due colonne, al fine di aumentare il numero totale di piatti teorici del sistema e migliorare la selettività cromatografica. In tutte le prove sono state impiegate le stesse fasi mobili, ovvero metanolo come fase A ed una miscela di isopropanolo/esano (50:50, v/v) come fase B.

Le prime separazioni sono state condotte su colonna *Prontosil C₃₀*, caratterizzata da un'elevata efficienza, sia per la sua lunghezza (25 cm) che per il piccolo diametro delle particelle (3 μm). La

colonna veniva termostata a 19 °C, infatti, secondo quanto riportato nelle specifiche tecniche, valori maggiori o uguali ai 22 °C causano perdita di selettività.

Lavorando a un flusso di 1 mL/min, mantenendo per 1 min il 100% di metanolo, arrivando poi linearmente in 15 min dallo 0% al 75% di fase B, e restando per 15 min al 99.5% di fase B, si aveva la coeluizione delle coppie, **retinil laurato/linolenato** e **retinil palmitoleato/linoleato**.

Su questa colonna, con il gradiente impostato, era possibile verificare che ciascun gruppo metilenico della catena di acido grasso contribuisce con 0.68 min al tempo di ritenzione del corrispondente estere, secondo la seguente relazione:

$$tr_{\text{retinil estere}} = (tr_{\text{retinolo}} + \text{numero di gruppi CH}_2 \text{ nella catena di acido grasso} \times 0.68 \text{ min}).$$

I gruppi metilici e i gruppi -CH=, coinvolti nei doppi legami delle catene insature, non contribuivano al tr del retinil estere. Su tale base è spiegabile la coeluizione **retinil laurato/linolenato** (10 gruppi metilenici per entrambi) e **retinil palmitoleato/linoleato** (12 gruppi metilenici per entrambi).

L'impostazione di gradienti più lenti, in modo che, dopo il primo minuto al 100% di metanolo, la fase B in 20 minuti arrivasse (1) al 50% e (2) al 30%, comportava:

- (1) una maggiore separazione, non del tutto completa però, della coppia **retinil palmitoleato/linoleato** ed il permanere della coeluizione **retinil laurato/linolenato**;
- (2) la non risoluzione della coeluizione **retinil laurato/linolenato**, alla quale si aggiungevano nuove coeluizioni: **retinil oleato/pentadecanoato** e **retinil palmitato/eptadecanoato/stearato**. Inoltre, l'eccessiva permanenza in colonna, comportava l'allargamento dei picchi cromatografici a seguito del fenomeno della diffusione longitudinale.

Per aumentare l'efficienza cromatografica si è pensato, dunque, di assemblare un sistema tandem accoppiando in serie diversi tipi di colonne, lavorando sempre ad 1 mL/min ed impostando in tutti i casi il gradiente (1). Gli accoppiamenti e le coeluizioni presenti sono riportati in tabella 29:

Tabella 29: coeluizioni presenti con i diversi accoppiamenti utilizzati durante questo lavoro.

Sistemi tandem di colonne	(A) Phenomenex ODS30 + Alltima C ₁₈	(B) Supelcosil C ₁₈ + Alltima C ₁₈	(C) TSKgel Super-ODS + Alltima C ₁₈	(D) TSKgel Super-ODS + Prontosil C ₃₀
Coeluizioni/ separazioni parziali	retinil palmitoleato/miristato/ linoleato e retinil oleato/palmitato/ eptadecanoato/ stearato/eicosanoato	retinil palmitoleato/miristato/ linoleato e retinil oleato/palmitato	retinil palmitoleato/ miristato/ linoleato e retinil oleato/palmitato	retinil palmitoleato/ linoleato

(A) - L'accoppiamento *Phenomenex ODS30 + Alltima C₁₈* era quello che forniva i risultati peggiori, con numerose coeluizioni specialmente nell'ultima parte della corsa cromatografica (figura 45, pannello A); l'eccessiva lunghezza del sistema ed il diametro delle particelle (5 μm) erano poi responsabili di tempi di ritenzione elevati. Abbiamo quindi provato sia a diminuire la lunghezza totale del sistema (con l'accoppiamento B), che la dimensione del diametro delle particelle di impaccamento (con l'accoppiamento C), facendo precedere la Alltima C₁₈ da:

(B) - una colonna *SupelcosilTM C₁₈* (4.6 x 50 mm; 5.0 μm); in questo caso il picco relativo alla coeluizione **retinil palmitoleato/miristato** non era ancora completamente separato da quello del **retinil linoleato**, e si aveva un unico picco cromatografico per la coppia **retinil oleato/palmitato** (figura 45, pannello B);

(C) - una colonna *TSKgel Super-ODS* impaccata con particelle di diametro inferiore (2 μm); si aveva lo stesso risultato del sistema (B), rispetto alla separazione tra **retinil palmitoleato/miristato** e **retinil linoleato**, mentre cominciava ad aversi una parziale separazione tra i picchi del **retinil oleato** e del **retinil palmitato** (figura 45, pannello C).

(D) - Tra tutti gli accoppiamenti tentati, una risoluzione cromatografica superiore era conseguita grazie all'unione in serie delle due colonne *TSKgel Super-ODS + Prontosil C₃₀*. Si otteneva infatti la completa separazione di tutti i retinil esteri selezionati, ad eccezione della coppia **retinil palmitoleato/linoleato** (figura 45, pannello D).

L'accoppiamento (B) permetteva però di ottenere picchi più stretti, e quindi un rapporto S/N maggiore, rispetto agli altri accoppiamenti testati; tali prestazioni risultavano determinanti nel caso di una matrice come il latte ricca di interferenti lipidici che possono comportare soppressione del segnale mass spettrometrico. Pertanto, tale accoppiamento veniva selezionato per l'identificazione e la quantificazione dei retinil esteri oggetto di studio, con l'eccezione di **retinil oleato**, **retinil palmitato** e **retinil miristato**, per i quali si ricorreva all'utilizzo del sistema tandem (D).

Per i due accoppiamenti selezionati, sono state poi realizzate diverse prove variando il flusso della fase mobile: 0.8 mL/min, 1 mL/min e 1.2 mL/min. I risultati migliori erano ottenuti con un flusso della fase mobile pari ad 1 mL/min, sia in termini di LODs più bassi, che come separazione cromatografica. Con un flusso di 0.8 mL/min gli analiti rimanevano in colonna per un tempo maggiore, per cui l'effetto della diffusione longitudinale diventava importante.

I due sistemi tandem di colonne selezionati in questo lavoro di tesi consentono, pertanto, la corretta identificazione di quattordici retinoidi, numero decisamente elevato rispetto a quello considerato nei precedenti studi. L'accurata ottimizzazione delle condizioni cromatografiche ha permesso di risolvere coeluizioni, o comunque separazioni non complete, spesso riportate in letteratura come, ad esempio, quelle relative alle coppie retinil oleato/palmitato [79, 82] e retinil miristato/palmitoleato

[8, 89]. Nel nostro caso, rimane irrisolta soltanto la non completa separazione del retinil palmitoleato dal retinil linoleato.

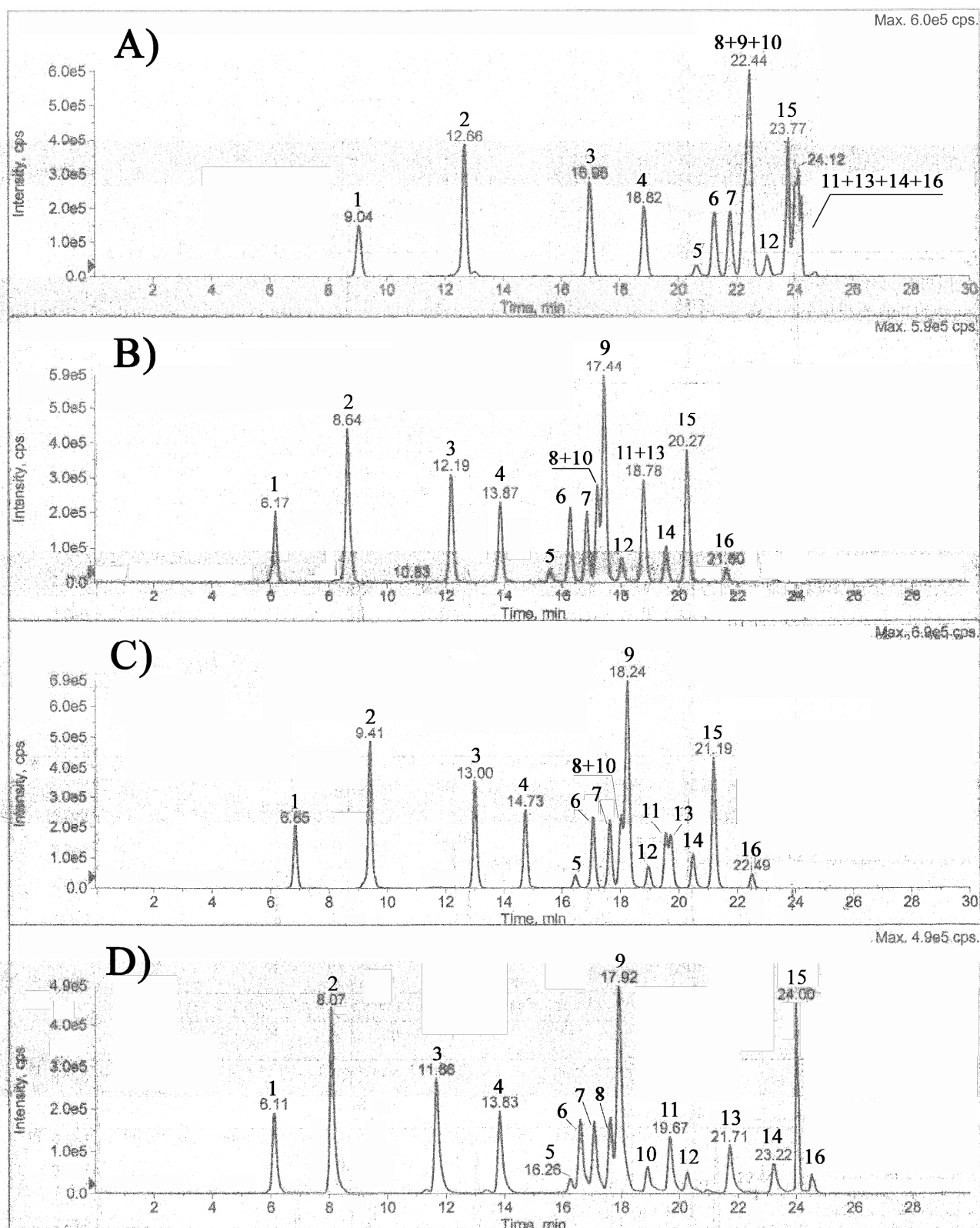


Figura 45: corrente SRM estratta per la transizione 269/119 m/z, ottenuta con i sistemi tandem di colonne testati durante la fase di ottimizzazione della separazione cromatografica: A) Phenomenex ODS30 + Alltima C₁₈, B) SupelcosilTM C₁₈ + Alltima C₁₈, C) TSKgel Super-ODS + Alltima C₁₈ e D) TSKgel Super-ODS + Prontosil C₃₀.

Di seguito riportiamo la legenda per l'identificazione dei picchi cromatografici.

Picco	Identificazione	Picco	Identificazione	Picco	Identificazione	Picco	Identificazione
1	Retinolo	5	Retinil laurato	9	Retinil linoleato	13	Retinil palmitato
2	Retinil propionato	6	Retinil linolenato	10	Retinil miristato	14	Retinil eptadecanoato
3	Retinil caprilato	7	Retinil arachidonato	11	Retinil oleato	15	Retinil stearato
4	Retinil caprato	8	Retinil palmitoleato	12	Retinil pentadecanoato	16	Retinil eicosanoato

2.3.4 OTTIMIZZAZIONE DELLA PROCEDURA ESTRATTIVA

Lo studio dei recuperi, come tutte le altre prove che hanno richiesto l'uso di una matrice reale, è stato effettuato su aliquote prelevate da un unico campione del latte crudo delle diverse specie animali selezionate.

Inizialmente, è stata testata la procedura estrattiva già sviluppata per la caratterizzazione della frazione vitaminica liposolubile e carotenoidea del latte vaccino, basata su deproteinizzazione-estrazione diretta con solvente, e di seguito sinteticamente riportata. Sei *mL* di latte crudo erano deproteinizzati mediante aggiunta di etanolo (18 *mL*) allo 0.1% (*w/v*) in BHT e trattamento ad ultrasuoni. L'estrazione era realizzata con tre aliquote di esano allo 0.1% (*w/v*) in BHT, la prima di 12 *mL* e le successive di 6 *mL*; la miscela era ogni volta sottoposta ad agitazione su stirrer e vortex, bagno ad ultrasuoni e centrifuga (a 0 °C, 6000 *rpm* per 10 minuti). I tre estratti organici erano riuniti e conservati alla temperatura di -18 °C per 1 *h*, al fine di favorire la precipitazione della frazione lipidica presente. Il surnatante, prelevato dopo centrifugazione, era infine evaporato a 30 °C sotto un leggero flusso di azoto fino ad un volume di 250 μ L e portato a 500 μ L con una soluzione di isopropanolo:esano 75:25 (*v/v*) allo 0.1% (*w/v*) in BHT. Venti μ L erano iniettati nel sistema HPLC-DAD-MS/MS.

Dato che la componente lipidica presente (particolarmente elevata nel caso del latte di bufala e di pecora) può influenzare l'efficienza della ionizzazione chimica, inficiando sensibilità e limiti del metodo, sono state effettuate delle prove per cercare di rimuovere parte dei grassi coestratti. A tale scopo, la procedura precedentemente descritta veniva ripetuta dopo aver ridotto il volume dell'estratto in esano da 24 *mL* a 20 *mL* per evaporazione a 30 °C, prima dell'unico passaggio di 1 *h* a bassa temperatura.

Sulla base dei risultati ottenuti, del tutto simili sia in termini di aree che di rapporti S/N, si decideva di procedere senza l'aggiunta di questo ulteriore step operativo nel caso del latte vaccino, caprino e pecorino, seguendo quindi la procedura inizialmente descritta in questo paragrafo. Nel caso del latte

bufalino, invece, con tale protocollo d'estrazione il surnatante finale non poteva essere concentrato per evaporazione al di sotto di 450 μL , presentando inoltre una maggiore consistenza oleosa rispetto a quanto ottenibile con gli altri tipi di latte testati.

L'estrazione veniva quindi ripetuta concentrando i 24 mL di estratto organico per evaporazione a 30 $^{\circ}\text{C}$ fino ad un volume pari a:

A) 5 mL , prima della conservazione a -18 $^{\circ}\text{C}$ per 1 h. Ciò non comportava alcuna riduzione significativa nella solubilità della frazione lipidica, dal momento che in seguito all'evaporazione finale a 30 $^{\circ}\text{C}$ non si riusciva a concentrare al di sotto dei 400 μL .

B) 2 mL , conservati a -18 $^{\circ}\text{C}$ per 40 min. Il surnatante, prelevato dopo centrifugazione (a 0 $^{\circ}\text{C}$, 6000 rpm per 10 min), era evaporato fino al volume di 1 mL , conservato a -18 $^{\circ}\text{C}$ per altri 40 min, nuovamente centrifugato ed evaporato a 30 $^{\circ}\text{C}$ fino a 250 μL . Infine, l'estratto era portato a 500 μL con una soluzione di isopropanolo:esano 75:25 (v/v) allo 0.1% (w/v) in BHT e 20 μL iniettati nel sistema HPLC-MS/MS.

C) 1.5 mL , portato a 3 mL con isopropanolo allo 0.1% (w/v) in BHT e quindi conservato a -18 $^{\circ}\text{C}$ per 40 min per poi procedere analogamente a quanto descritto al punto **B)**. L'aggiunta di isopropanolo aveva lo scopo di aumentare la costante dielettrica del mezzo, diminuendo così la solubilità della frazione lipidica.

Sia con la procedura **B)** che con quella **C)**, dopo il secondo step a bassa temperatura, si osservava la formazione di un precipitato bianco e tramite evaporazione era possibile concentrare l'estratto fino al volume di 250 μL . La procedura **B)** era però selezionata come definitiva per il latte di bufala, dal momento che si ottenevano, per i retinoidi endogeni, valori di recupero percentuale superiori e riproducibili, a differenza di quanto conseguibile con il protocollo **C)** (vedi tabella 30), i cui cromatogrammi mostravano inoltre distorsioni nella forma dei picchi cromatografici.

Tabella 30: confronto tra i valori di recupero ottenuti applicando le due diverse procedure estrattive B) e C) per due aliquote di un campione di latte crudo di bufala ($V_f=500 \mu\text{L}$; 20 μL iniettati).

Analiti rivelati	Transizione SRM più intensa	Procedura (B)	Procedura (C)
		Recuperi %	
Retinolo ^a	269/119	42	33
Retinil linolenato ^b	269/199	87	65
Retinil linoleato ^a	269/199	87	71
Retinil oleato ^a	269/119	100	88
Retinil palmitato ^a	269/119	90	78
Retinil eptadecanoato ^b	269/199	72	61
Retinil stearato ^b	269/119	82	73

^aaccoppiamento TSKgel Super-ODS + ProntoSilC₃₀.

^baccoppiamento SupelcosilTM C₁₈ + Alltima C₁₈.

Dalla letteratura [21] è noto che i retinoidi sono sensibili al calore e che i trattamenti termici possono favorirne l'isomerizzazione *trans-cis*. Poiché il protocollo d'estrazione messo a punto prevede l'evaporazione del campione, è stato eseguito uno studio preliminare delle risposte evaporate, sottoponendo singolarmente gli analiti a diverse temperature di evaporazione, ovvero 25 °C, 30 °C e 35 °C, in bagno ad acqua termostata. Per riprodurre le condizioni sperimentali della procedura definitiva, sono state preparate sei provette con fondo conico sfinato, in modo da ottenere due replicate per ogni valore di temperatura, contenenti ciascuna 24 mL di esano allo 0.1% (w/v) in BHT, cui erano aggiunti 50 µL di una soluzione 10 ng/µL in metanolo 0.1% (w/v) in BHT dell'analita in esame. Si concentrava poi a 250 µL sotto un leggero flusso di azoto, impostando la temperatura ad uno dei tre valori sopra indicati. Venivano poi aggiunti 250 µL di una soluzione di isopropanolo:esano 75:25 (v/v) allo 0.1% (w/v) in BHT e venti µL erano iniettati nel sistema HPLC-MS/MS, per un totale di 20 ng iniettati. Per ogni analita, l'area ottenuta con tale procedimento è stata confrontata con quella di una soluzione di lavoro, non sottoposta a trattamento termico; i risultati migliori erano conseguiti alla temperatura di 30 °C.

L'evaporazione condotta a 30 °C non comportava degradazione o isomerizzazione delle forme originariamente presenti, ad eccezione del retinolo: estraendo infatti le due correnti SRM selezionate era possibile osservare, oltre al picco relativo all'all-*trans*-retinolo ($t_r = 6.17 \text{ min}$), un altro picco con $t_r = 5.16 \text{ min}$, riconducibile presumibilmente ad un suo isomero *cis* (figura 46, pannello A). Circa il 90% dell'all-*trans*-retinolo subiva tale isomerizzazione. Soltanto l'utilizzo del sistema tandem di colonne C₁₈/C₁₈ consentiva di separare questo isomero dalla forma all-*trans*, mentre l'accoppiamento C₁₈/C₃₀ si rivelava inefficace dal momento che i due isomeri geometrici coeludevano in un unico picco cromatografico al tempo di ritenzione caratteristico dell'all-*trans* (figura 46, pannello B).

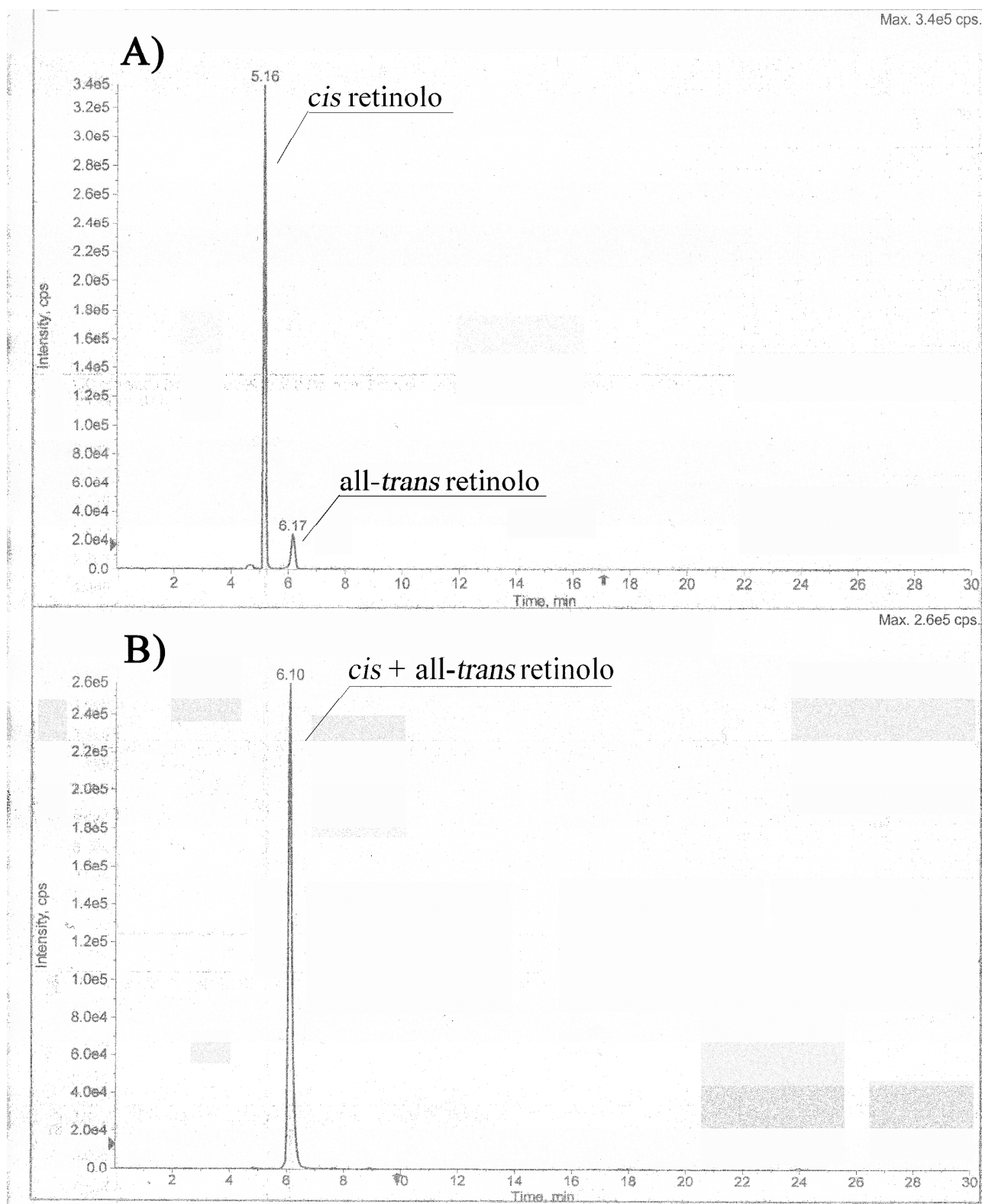


Figura 46: isomerizzazione *trans-cis* del retinolo in solvente a seguito del trattamento termico a 30 °C. La risposta evaporata era analizzata su entrambi i sistemi tandem di colonne cromatografiche selezionati: A) C_{18}/C_{18} e B) C_{18}/C_{30} (20 ng iniettati).

È stato valutato, infine, il comportamento dei retinoidi alla temperatura di 30 °C in matrice, ovvero nel latte crudo delle quattro specie animali considerate. A tal fine, si confrontavano le aree dei picchi cromatografici degli estratti di due campioni di controllo, trattati secondo la procedura

definitiva selezionata, fortificati prima e dopo l'evaporazione finale. Analogamente a quanto accadeva in solvente, non si osservava degradazione degli analiti e si riscontrava isomerizzazione solo per il retinolo. Tale fenomeno, tuttavia, non era sempre verificato e risultava indipendente dal tipo di latte analizzato.

2.4 RISULTATI E DISCUSSIONE

2.4.1 STABILITÀ DEGLI ANALITI NELLA MISCELA DI LAVORO

a. vitamine liposolubili e carotenoidi

Nell'arco di un mese è stata verificata a giorni alterni (festivi esclusi) la stabilità delle soluzioni degli analiti in miscela, iniettando nel sistema HPLC-MS/MS 10 μL di una soluzione contenente retinolo, colecalciferolo, ergocalciferolo, vitameri K, α - e γ -tocoferolo e β -carotene alla concentrazione di 2,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$, mentre δ -tocoferolo, luteina, zeaxantina e β -cryptoxantina alla concentrazione di 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Ogni giorno la media delle aree dei picchi di ciascun analita (due replicate) veniva riportata in grafico rispetto al giorno di iniezione. Si riporta a titolo di esempio il grafico di stabilità per l' α -tocoferolo (figura 47) che mostra un andamento costante dei valori delle aree durante l'arco di tempo pari a 30 giorni. Un andamento simile viene riscontrato per retinolo, ergocalciferolo, colecalciferolo, fillochinone, menachinone-4, δ - e γ -tocoferolo.

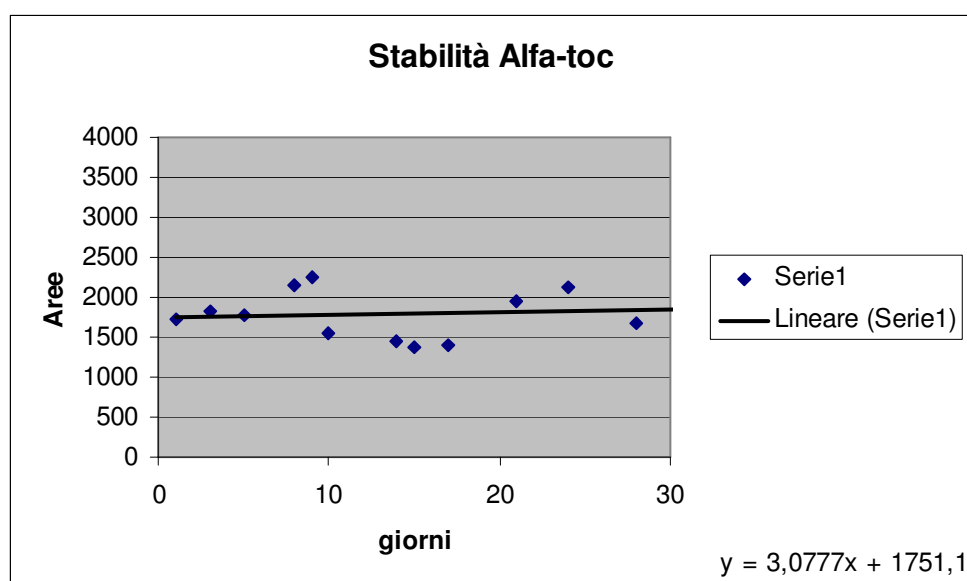


Figura 47: diagramma stabilità di α -tocoferolo nella miscela di lavoro.

Per le xantofille luteina, zeaxantina e β -cryptoxantina e per il β -carotene si evidenziava una diminuzione delle aree a partire dal quindicesimo giorno dalla data di preparazione della soluzione degli analiti in miscela.

b. retinil esteri

La stabilità delle *stock solutions*, preparate come descritto nel paragrafo 2.1.3, è stata valutata nell'arco di un mese. A tale scopo si è proceduto alla rapida preparazione di una soluzione di lavoro composta in metanolo, a partire dalle soluzioni individuali di tutti gli analiti, successivamente diluita e immediatamente iniettata (20 ng) nel sistema HPLC-MS/MS (tempo $t = 0$). Le *stock solutions* erano, quindi, conservate in freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, ed ogni 7 giorni, utilizzate per preparare una nuova soluzione di lavoro composta con la medesima procedura. La media delle aree dei picchi di ciascun analita (due replicate) veniva riportata in grafico rispetto al giorno d'iniezione. Si riporta a titolo d'esempio il grafico di stabilità per il retinil stearato (figura 48), che mostra un andamento costante dei valori delle aree durante l'arco di tempo pari a 30 giorni. Un andamento simile veniva riscontrato anche per gli altri retinoidi in studio.

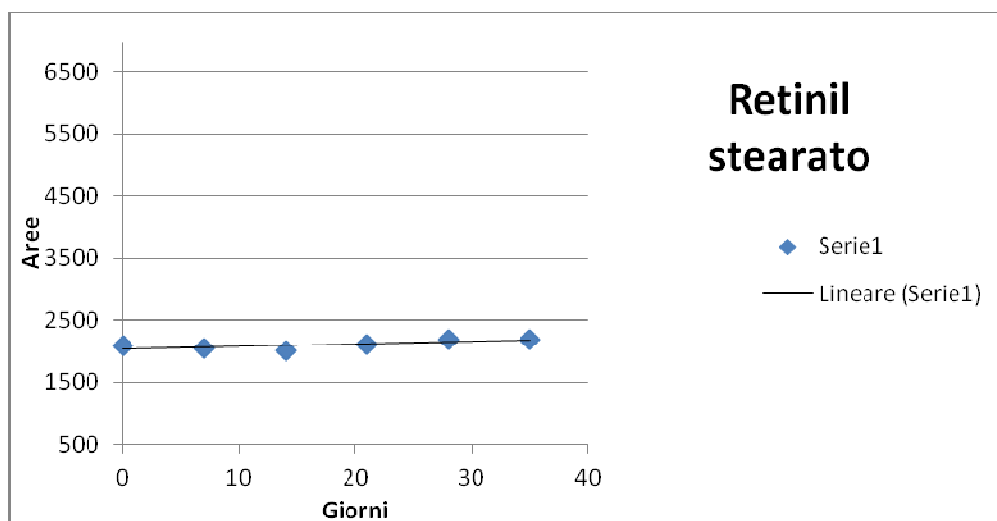


Figura 48: diagramma di stabilità della stock solution del retinil stearato (accoppiamento TSKgel Super-ODS+Prontosil C₃₀). Le analisi sono state effettuate a distanza di 7 giorni.

2.4.2 VALIDAZIONE DEL METODO E ANALISI QUANTITATIVA

Il latte di mucca è stato utilizzato per sviluppare il metodo analitico che è stato poi ottimizzato e validato per ogni tipo di latte. Non essendo disponibili dei bianchi, l'analisi quantitativa di vitamine liposolubili e carotenoidi e dei retinil esteri era effettuata con il metodo delle aggiunte standard, che consentiva sia di stimare la quantità incognita degli analiti presenti nei diversi campioni, sia di

valutare sensibilità e range dinamico lineare. Recuperi, precisione e limiti del metodo erano valutati dopo aver misurato il livello endogeno di ciascun analita nella matrice alimentare.

a. Standard interno

Nell'analisi di matrici complesse come quelle alimentari o biologiche, in assenza di un'adeguata separazione cromatografica, la risposta mass spettrometrica dell'analita potrebbe essere compromessa dalla coeluizione con gli interferenti presenti nel campione originale, anche se non direttamente ionizzabili. Alla base dell'effetto matrice vi è quindi la modificazione della ionizzazione dell'analita target ad opera di composti endogeni, la cui entità può variare, per uno stesso tipo di matrice, in dipendenza dei campioni analizzati e della natura del composto di interesse, portando a possibili errori nell'analisi quantitativa.

L'effetto matrice può essere eliminato o comunque controllato: *i)* utilizzando un'efficiente procedura di clean-up dei campioni, *ii)* modificando le condizioni cromatografiche (es. aumentando il tempo di ritenzione dell'analita e quindi la separazione cromatografica rispetto agli interferenti), *iii)* adottando l'uso di uno standard interno [106].

Lo standard interno, oltre ad avere proprietà chimico-fisiche analoghe alle molecole da determinare, deve avere un elevato grado di purezza, deve essere inerte verso gli analiti, e naturalmente non deve essere presente nel campione. Gli standard interni possono essere classificati in tre categorie: 1) lo standard interno ideale è un analogo strutturale marcato con isotopi stabili (in spettrometria di massa un trideuterato, in modo che il suo ione molecolare differisca almeno di tre unità dall'analogo non marcato e non ne infici l'analisi quantitativa cadendo al di fuori della sua distribuzione isotopica); 2) un omologo strutturale o 3) un composto della stessa famiglia chimica (es. se l'analita è un acido carbossilico, si può scegliere come standard interno un composto con una struttura diversa, ma dotato dello stesso gruppo funzionale). I vari tipi di standard interni indicati sono stati classificati in base alla loro utilità e al prezzo. Infatti, nel caso degli analoghi strutturali marcati, la sintesi utilizzata per la deuterazione risulta spesso costosa. Nel caso in cui si utilizzino omologi strutturali o composti appartenenti alla stessa famiglia chimica, gli ioni dovrebbero avere masse differenti da quelle del composto in esame se introdotti direttamente in uno spettrometro di massa; se, tuttavia, sussiste una separazione cromatografica e il tempo di ritenzione dell'analita differisce da quello dello standard interno, i due composti possono avere anche la stessa massa.

La scelta, come standard interno, di una molecola con proprietà chimiche e fisiche il più possibile vicine a quelle dell'analita da misurare, dovrebbe garantire, per qualsiasi batch di latte analizzato, condizioni simili a quelle sperimentate dall'analita in studio; in questo modo il rapporto delle aree dei due composti rimane immutato durante la procedura.

Questa scelta non assicura l'eliminazione del fenomeno, ma piuttosto che l'accuratezza/precisione del metodo non sia inficiata dalla presenza di composti interferenti. Infatti, una modificazione della risposta potrebbe comunque essere presente e comportare un abbassamento della sensibilità.

Esistono due approcci differenti tramite i quali lo standard interno può essere introdotto nel campione [107]: il metodo del surrogato e il metodo volumetrico. Entrambi questi metodi sono utili nell'analisi quantitativa in LC-MS, per ridurre gli errori attribuibili alla presenza di un effetto matrice.

Il *metodo del surrogato* prevede che lo standard interno sia aggiunto al campione prima di sottoporlo al trattamento preliminare che precede l'analisi strumentale; in questo modo, grazie all'analogia di comportamento tra analita e surrogato, vengono compensati gli errori generati dalla perdita di segnale, attribuibile alla fase preparativa (es. estrazione, clean-up).

Nel *metodo volumetrico*, invece, l'aggiunta dello standard interno avviene al termine della procedura estrattiva e immediatamente prima dell'analisi, al fine di controllare e compensare eventuali errori di tipo strumentale (es. volume di iniezione, fluttuazioni nel processo di ionizzazione).

In questo lavoro di tesi è stata valutata l'applicazione di entrambi i metodi per l'introduzione dello standard interno, sia per la determinazione di vitamine liposolubili e carotenoidi, sia per la determinazione dei retinoidi, in termini di recuperi e di deviazione standard ad essi associata.

Nel caso di vitamine e carotenoidi si ottenevano migliori risultati con il metodo del surrogato, mentre per gli esteri della vitamina A i recuperi risultavano più elevati con il metodo volumetrico.

Mentre per vitamine e carotenoidi, come standard interni, sono stati selezionati analoghi strutturali deuterati, per i retinil esteri, non essendo commercialmente disponibili dei deuterati dei retinoidi oggetto di studio, come standard interni sono stati scelti degli omologhi strutturali, ovvero il *retinil propionato* e il *retinil arachidonato*, in virtù dell'elevata purezza e del costo ridotto di questi standard, avendo preliminarmente verificato l'assenza di tali composti nel latte delle diverse specie animali in esame.

b. Metodo delle aggiunte standard: range dinamico lineare e sensibilità

Il metodo delle aggiunte standard sviluppato è stato in ogni caso effettuato prelevando un campione di 36 mL di latte crudo e suddividendolo, per motivi di praticità operativa, in sei aliquote da 6 mL ciascuna.

Per **vitamine liposolubili e carotenoidi**, alle sei sono stati aggiunti 250 μL di una soluzione contenente gli standard interni alle seguenti concentrazioni: 80 ng μL^{-1} per retinolo- d_5 e α -tocoferolo- d_6 ; 2 ng μL^{-1} per fillochinone- d_7 , colecalciferolo- d_3 e *trans*- β -apo-8'-carotenale. Cinque

di queste aliquote sono state fortificate con concentrazioni crescenti degli standard (vedi tabella 31) e, trascorso un periodo di 30 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione continua, tutte le aliquote sono state sottoposte al processo di estrazione, secondo quanto descritto nel paragrafo 2.1.4. Venti μL erano iniettati sul sistema HPLC-DAD-QqQ, usando una colonna C_{30} per l'analisi dei carotenoidi e il sistema accoppiato di colonne C_{18} per l'analisi delle vitamine liposolubili; a causa dell'elevato contenuto di retinolo e di α - e γ -tocoferolo, i campioni erano rianalizzati iniettando 5 μL .

Tabella 31: livelli di aggiunta per vitamine liposolubili e carotenoidi per il metodo delle aggiunte.

Aliquote estratto	Volume aggiunto della soluzione a due livelli di concentrazione (2 e 80 ng/ μL) *	Livelli di aggiunta		20 μL Iniettati ($V_f = 200 \mu\text{L}$)
Aliquota 1	0 μL	Ao	0 ng	δ
Aliquota 2	25 μL	A1	50 ng 500 ng	$\delta + 5 \text{ ng}$ $\delta + 50 \text{ ng}$
Aliquota 3	50 μL	A2	100 ng 1000 ng	$\delta + 10 \text{ ng}$ $\delta + 100 \text{ ng}$
Aliquota 4	250 μL	A3	500 ng 5000 ng	$\delta + 50 \text{ ng}$ $\delta + 500 \text{ ng}$
Aliquota 5	500 μL	A4	1000 ng 10000 ng	$\delta + 100 \text{ ng}$ $\delta + 1000 \text{ ng}$
Aliquota 6	1000 μL	A5	2000 ng 20000 ng	$\delta + 200 \text{ ng}$ $\delta + 2000 \text{ ng}$

*A causa dei diversi livelli di concentrazione degli analiti in matrice, la soluzione utilizzata per le fortificazioni era stata preparata a due diversi valori di concentrazione: 2 ng/ μL per δ -tocoferolo, β -carotene, luteina, zeaxantina, β -criptoxantina, vitameri D e K, e 80 ng/ μL per retinolo e α - e γ -tocoferolo.

Tabella 32: livelli di concentrazione di vitamine liposolubili e carotenoidi nelle diverse aliquote.

^a δ è la quantità endogena presente in un campione di latte.

Analiti	Concentrazione analiti nelle aliquote (6 mL)					
	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅
	($\mu\text{g L}^{-1}$)					
Retinolo	δ^a	$\delta + 333.3$	$\delta + 666.7$	$\delta + 3333$	$\delta + 6667$	$\delta + 13333$
α -tocoferolo	δ	$\delta + 333.3$	$\delta + 666.7$	$\delta + 3333$	$\delta + 6667$	$\delta + 13333$
δ -tocoferolo	δ	$\delta + 8.333$	$\delta + 16.67$	$\delta + 83.33$	$\delta + 166.7$	$\delta + 333.3$
γ -tocoferolo	δ	$\delta + 333.3$	$\delta + 666.7$	$\delta + 3333$	$\delta + 6667$	$\delta + 13333$
Ergocalciferolo	δ	$\delta + 8.333$	$\delta + 16.67$	$\delta + 83.33$	$\delta + 166.7$	$\delta + 333.3$
Colecalciferolo	δ	$\delta + 8.333$	$\delta + 16.67$	$\delta + 83.33$	$\delta + 166.7$	$\delta + 333.3$
Filloquinone	δ	$\delta + 8.333$	$\delta + 16.67$	$\delta + 83.33$	$\delta + 166.7$	$\delta + 333.3$
Menachinone-4	δ	$\delta + 8.333$	$\delta + 16.67$	$\delta + 83.33$	$\delta + 166.7$	$\delta + 333.3$
Luteina	δ	$\delta + 8.333$	$\delta + 16.67$	$\delta + 83.33$	$\delta + 166.7$	$\delta + 333.3$
Zeaxantina	δ	$\delta + 8.333$	$\delta + 16.67$	$\delta + 83.33$	$\delta + 166.7$	$\delta + 333.3$
β -criptoxantina	δ	$\delta + 8.333$	$\delta + 16.67$	$\delta + 83.33$	$\delta + 166.7$	$\delta + 333.3$
β -carotene	δ	$\delta + 8.333$	$\delta + 16.67$	$\delta + 83.33$	$\delta + 166.7$	$\delta + 333.3$

Nel caso dei **retinil esteri**, al termine della procedura estrattiva descritta dettagliatamente nel paragrafo 2.1.4, per quanto riguarda il latte vaccino, caprino e pecorino, gli estratti organici, provenienti dalle sei aliquote di latte, erano riuniti ed addizionati dell'esano allo 0.1% (w/v) in BHT; i 144 *mL* complessivi erano nuovamente suddivisi in sei aliquote omogenee da 24 *mL*.

Nel caso del latte di bufala, dopo il secondo step di concentrazione e conservazione a bassa temperatura, il volume totale di esano era riportato a 6 *mL* e ripartito in aliquote da 1 *mL* ciascuna.

In tutti e due i casi, prima dell'ultima evaporazione, le sei aliquote erano addizionate di 50 μL degli SI alla concentrazione di 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$, mentre solo cinque di esse erano fortificate con quantità crescenti opportunamente calcolate degli analiti (tabelle 33, 34, 35 e 36) individuati preliminarmente nei campioni di latte delle diverse specie; seguiva, infine, l'analisi HPLC-MS/MS con entrambi i sistemi tandem di colonne cromatografiche selezionati.

Tabella 33: livelli di aggiunta per i retinoidi identificati nel latte crudo di *pecora*.

Aliquote da 24 mL	20 μ L iniettati $V_f = 500 \mu$ L						
	Retinolo	Retinil Linolenato	Retinil Oleato	Retinil Palmitato	Retinil Eptadecanoato	Retinil Stearato	Retinil Eicosanoato
A ₀	δ	δ	δ	δ	δ	δ	δ
A ₁	$\delta + 10 \text{ ng}$	$\delta + 100 \text{ ng}$	$\delta + 100 \text{ ng}$	$\delta + 100 \text{ ng}$	$\delta + 60 \text{ ng}$	$\delta + 24 \text{ ng}$	$\delta + 160 \text{ ng}$
A ₂	$\delta + 20 \text{ ng}$	$\delta + 200 \text{ ng}$	$\delta + 200 \text{ ng}$	$\delta + 200 \text{ ng}$	$\delta + 120 \text{ ng}$	$\delta + 48 \text{ ng}$	$\delta + 320 \text{ ng}$
A ₃	$\delta + 50 \text{ ng}$	$\delta + 500 \text{ ng}$	$\delta + 500 \text{ ng}$	$\delta + 500 \text{ ng}$	$\delta + 300 \text{ ng}$	$\delta + 120 \text{ ng}$	$\delta + 800 \text{ ng}$
A ₄	$\delta + 200 \text{ ng}$	$\delta + 2000 \text{ ng}$	$\delta + 2000 \text{ ng}$	$\delta + 2000 \text{ ng}$	$\delta + 1200 \text{ ng}$	$\delta + 480 \text{ ng}$	$\delta + 3200 \text{ ng}$
A ₅	$\delta + 400 \text{ ng}$	$\delta + 4000 \text{ ng}$	$\delta + 4000 \text{ ng}$	$\delta + 4000 \text{ ng}$	$\delta + 2400 \text{ ng}$	$\delta + 960 \text{ ng}$	$\delta + 6400 \text{ ng}$

Tabella 34: livelli di aggiunta per i retinoidi identificati nel latte crudo di *capra*.

Aliquote da 24 mL	20 μ L iniettati $V_f = 500 \mu$ L							
	Retinolo	Retinil Caprato	Retinil Linolenato	Retinil Oleato	Retinil Palmitato	Retinil Eptadecanoato	Retinil Stearato	Retinil Eicosanoato
A ₀	δ	δ	δ	δ	δ	δ	δ	δ
A ₁	$\delta + 10 \text{ ng}$	$\delta + 5 \text{ ng}$	$\delta + 50 \text{ ng}$	$\delta + 100 \text{ ng}$	$\delta + 100 \text{ ng}$	$\delta + 60 \text{ ng}$	$\delta + 24 \text{ ng}$	$\delta + 104 \text{ ng}$
A ₂	$\delta + 20 \text{ ng}$	$\delta + 10 \text{ ng}$	$\delta + 100 \text{ ng}$	$\delta + 200 \text{ ng}$	$\delta + 200 \text{ ng}$	$\delta + 120 \text{ ng}$	$\delta + 48 \text{ ng}$	$\delta + 208 \text{ ng}$
A ₃	$\delta + 50 \text{ ng}$	$\delta + 25 \text{ ng}$	$\delta + 250 \text{ ng}$	$\delta + 500 \text{ ng}$	$\delta + 500 \text{ ng}$	$\delta + 300 \text{ ng}$	$\delta + 120 \text{ ng}$	$\delta + 520 \text{ ng}$
A ₄	$\delta + 200 \text{ ng}$	$\delta + 100 \text{ ng}$	$\delta + 1000 \text{ ng}$	$\delta + 2000 \text{ ng}$	$\delta + 2000 \text{ ng}$	$\delta + 1200 \text{ ng}$	$\delta + 480 \text{ ng}$	$\delta + 2080 \text{ ng}$
A ₅	$\delta + 400 \text{ ng}$	$\delta + 200 \text{ ng}$	$\delta + 2000 \text{ ng}$	$\delta + 4000 \text{ ng}$	$\delta + 4000 \text{ ng}$	$\delta + 2400 \text{ ng}$	$\delta + 960 \text{ ng}$	$\delta + 4160 \text{ ng}$

Tabella 35: livelli di aggiunta per i retinoidi identificati nel latte crudo *vaccino*.

Aliquote da 24 mL	20 μ L iniettati $V_f = 500 \mu$ L							
	Retinolo	Retinil Linolenato	Retinil Linoleato	Retinil Miristato	Retinil Oleato	Retinil Palmitato	Retinil Eptadecanoato	Retinil Stearato
A ₀	δ	δ	δ	δ	δ	δ	δ	δ
A ₁	$\delta + 10 \text{ ng}$	$\delta + 88 \text{ ng}$	$\delta + 20 \text{ ng}$	$\delta + 50 \text{ ng}$	$\delta + 165 \text{ ng}$	$\delta + 165 \text{ ng}$	$\delta + 50 \text{ ng}$	$\delta + 20 \text{ ng}$
A ₂	$\delta + 20 \text{ ng}$	$\delta + 176 \text{ ng}$	$\delta + 40 \text{ ng}$	$\delta + 100 \text{ ng}$	$\delta + 330 \text{ ng}$	$\delta + 330 \text{ ng}$	$\delta + 100 \text{ ng}$	$\delta + 40 \text{ ng}$
A ₃	$\delta + 50 \text{ ng}$	$\delta + 440 \text{ ng}$	$\delta + 100 \text{ ng}$	$\delta + 250 \text{ ng}$	$\delta + 825 \text{ ng}$	$\delta + 825 \text{ ng}$	$\delta + 250 \text{ ng}$	$\delta + 100 \text{ ng}$
A ₄	$\delta + 200 \text{ ng}$	$\delta + 1760 \text{ ng}$	$\delta + 400 \text{ ng}$	$\delta + 1000 \text{ ng}$	$\delta + 3300 \text{ ng}$	$\delta + 3300 \text{ ng}$	$\delta + 1000 \text{ ng}$	$\delta + 400 \text{ ng}$
A ₅	$\delta + 400 \text{ ng}$	$\delta + 3520 \text{ ng}$	$\delta + 800 \text{ ng}$	$\delta + 2000 \text{ ng}$	$\delta + 6600 \text{ ng}$	$\delta + 6600 \text{ ng}$	$\delta + 2000 \text{ ng}$	$\delta + 800 \text{ ng}$

Tabella 36: livelli di aggiunta per i retinoidi identificati nel latte crudo di *bufala*.

Aliquote da 1 mL	20 μ L iniettati $V_f = 500 \mu$ L						
	Retinolo	Retinil Linolenato	Retinil Linoleato	Retinil Oleato	Retinil Palmitato	Retinil Eptadecanoato	Retinil Stearato
A ₀	δ	δ	δ	δ	δ	δ	δ
A ₁	$\delta + 10 \text{ ng}$	$\delta + 88 \text{ ng}$	$\delta + 20 \text{ ng}$	$\delta + 165 \text{ ng}$	$\delta + 165 \text{ ng}$	$\delta + 50 \text{ ng}$	$\delta + 20 \text{ ng}$
A ₂	$\delta + 20 \text{ ng}$	$\delta + 176 \text{ ng}$	$\delta + 40 \text{ ng}$	$\delta + 330 \text{ ng}$	$\delta + 330 \text{ ng}$	$\delta + 100 \text{ ng}$	$\delta + 40 \text{ ng}$
A ₃	$\delta + 50 \text{ ng}$	$\delta + 440 \text{ ng}$	$\delta + 100 \text{ ng}$	$\delta + 825 \text{ ng}$	$\delta + 825 \text{ ng}$	$\delta + 250 \text{ ng}$	$\delta + 100 \text{ ng}$
A ₄	$\delta + 200 \text{ ng}$	$\delta + 1760 \text{ ng}$	$\delta + 400 \text{ ng}$	$\delta + 3300 \text{ ng}$	$\delta + 3300 \text{ ng}$	$\delta + 1000 \text{ ng}$	$\delta + 400 \text{ ng}$
A ₅	$\delta + 400 \text{ ng}$	$\delta + 3520 \text{ ng}$	$\delta + 800 \text{ ng}$	$\delta + 6600 \text{ ng}$	$\delta + 6600 \text{ ng}$	$\delta + 2000 \text{ ng}$	$\delta + 800 \text{ ng}$

Le rette di calibrazione erano costruite utilizzando la transizione SRM più intensa (*quantifier transition*) e riportando in grafico, per ciascun analita, la risposta strumentale ($A_{\text{analita}}/A_{\text{standard interno}}$) vs il livello di fortificazione, utilizzando come modello per la regressione lineare l'equazione $y = b_0 + b_1x$ (figura 49). Per $x = 0$, la risposta strumentale $y = b_0$ è dovuta alla quantità incognita δ presente nel campione; il valore incognito δ è estrapolato sull'asse delle ascisse nel punto in cui $y = 0$.

per $y = 0$

$$x = -\delta$$

$$0 = b_0 + b_1(-\delta)$$

da cui

$$\delta = \frac{b_0}{b_1}$$

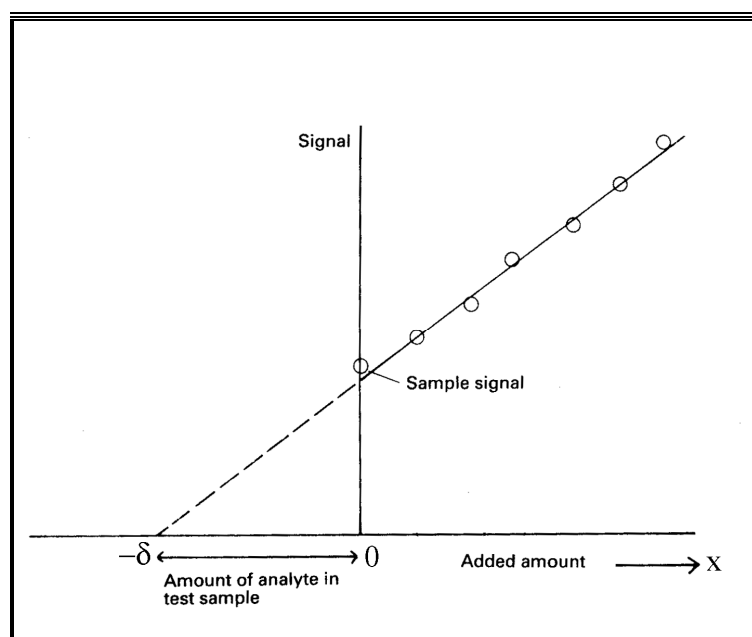


Figura 49: metodo delle aggiunte standard.

Possibili effetti erano evitati grazie all'elevata sensibilità della strumentazione LC-MS, all'uso del campionatore automatico e al lavaggio del sistema di iniezione con la fase B (isopropanolo:esano 50:50 v/v). L'assenza di questi è stata verificata iniettando metanolo (a causa dell'indisponibilità di un bianco) dopo l'analisi del campione fortificato nel punto più alto della curva relativa all'aggiunta standard (*Upper Limit Of Quantitation ULOQ*).

Per **vitamine liposolubili e carotenoidi** il range dinamico lineare era esplorato fino a:

- ✓ 200 ng iniettati per δ -tocoferolo, fillochinone, menachinone, coledalciferolo, ergocalciferolo, luteina, zeaxantina, β -criptoxantina, e β -carotene;
- ✓ 2000 ng iniettati per l' α - e γ -tocoferolo ed il retinolo.

I parametri della regressione lineare per il latte crudo vaccino sono riportati in tabella 37, mentre quelli degli altri tipi di latte sono riportati in tabella 46, insieme agli altri parametri di validazione.

Tabella 37: retta di calibrazione e coefficienti di correlazione delle vitamine liposolubili e carotenoidi nel latte crudo di mucca.

Analiti	Transizione SRM più intensa	Equazione della retta $y = b_0 + b_1 x$	Coefficiente di correlazione R^2
Retinolo	269/93	$y = 4,16 \cdot 10^7 + 3.36 \cdot 10^4 x$	0.9982
α -tocoferolo	430/165	$y = 3,7 \cdot 10^7 + 1.68 \cdot 10^4 x$	0.9974
δ -tocoferolo	402/177	$y = 8,55 \cdot 10^3 + 0.09 \cdot 10^3 x$	0.9949
γ -tocoferolo	416/151	$y = 1,22 \cdot 10^5 + 0.66 \cdot 10^4 x$	0.9983
Ergocalciferolo	385/259	$y = 8,52 \cdot 10^4 + 0.57 \cdot 10^4 x$	0.9990
Colecalciferolo	397/379	$y = 1,96 \cdot 10^4 + 1.32 \cdot 10^4 x$	0.9950
Filloquinone	451/187	$y = 7,13 \cdot 10^4 + 7.51 \cdot 10^5 x$	0.9986
Menachinone-4	445/187	$y = 7,3 \cdot 10^4 + 2.78 \cdot 10^4 x$	0.9989
Luteina	551/175	$y = 5,51 \cdot 10^4 + 1.06 \cdot 10^4 x$	0.9983
Zeaxantina	551/135	$y = 1,94 \cdot 10^3 + 0.34 \cdot 10^3 x$	0.9986
β -criptoxantina	553/119	$y = 3,32 \cdot 10^4 + 0.93 \cdot 10^4 x$	0.9962
β -carotene	537/177	$y = 3,97 \cdot 10^5 + 0.27 \cdot 10^3 x$	0.9965

Il coefficiente angolare rappresenta la sensibilità del metodo: il retinolo è uno degli analiti che risponde meglio, mentre il metodo è meno sensibile ad apprezzare variazioni di quantità iniettate di zeaxantina.

Nel caso dei **retinil esteri** invece, per ciascun analita, il coefficiente angolare, rappresentativo della sensibilità del metodo, risultava dello stesso ordine di grandezza per tutti e quattro i tipi di latte analizzati, indicando la presenza di un effetto matrice analogo negli estratti dai diversi campioni di latte. Il retinolo è l'analita che risponde meglio mentre, tra gli esteri, particolarmente sensibile è la risposta del retinil caprato e del retinil linoleato.

La bontà della regressione era valutabile attraverso i coefficienti di correlazione R^2 , compresi tra 0.9941 e 0.9999.

Tabella 38: retta di calibrazione e coefficienti di correlazione dei retinoidi identificati nel latte crudo di *pecora*.

Analiti	Transizione SRM più intensa	Equazione della retta $y = b_0 + b_1 x$	Coefficiente di correlazione R^2
Retinolo	269/119	$y = 1.33 \cdot 10^5 + 2.44 \cdot 10^4 x$	0.9997
Retinil linolenato	269/199	$y = 7.48 \cdot 10^4 + 427 x$	0.9999
Retinil oleato	269/119	$y = 1.27 \cdot 10^5 + 380 x$	0.9984
Retinil palmitato	269/119	$y = 1.83 \cdot 10^5 + 534 x$	0.9999
Retinil eptadecanoato	269/199	$y = 3.25 \cdot 10^5 + 861 x$	0.9993
Retinil stearato	269/119	$y = 5.79 \cdot 10^4 + 636 x$	0.9992
Retinil eicosanoato	269/119	$y = 9.46 \cdot 10^4 + 233 x$	0.9998

Tabella 39: retta di calibrazione e coefficienti di correlazione dei retinoidi identificati nel latte crudo di *capra*.

Analiti	Transizione SRM più intensa	Equazione della retta $y = b_0 + b_1 x$	Coefficiente di correlazione R^2
Retinolo	269/119	$y = 8.01 \cdot 10^4 + 1.18 \cdot 10^4 x$	0.9994
Retinil caprato	269/199	$y = 3.42 \cdot 10^4 + 4.31 \cdot 10^3 x$	0.9999
Retinil linolenato	269/199	$y = 2.95 \cdot 10^4 + 392 x$	0.9998
Retinil oleato	269/119	$y = 1.06 \cdot 10^5 + 388 x$	0.9999
Retinil palmitato	269/119	$y = 1.51 \cdot 10^5 + 629 x$	0.9999
Retinil eptadecanoato	269/199	$y = 1.55 \cdot 10^5 + 656 x$	0.9997
Retinil stearato	269/119	$y = 2.64 \cdot 10^4 + 709 x$	0.9998
Retinil eicosanoato	269/119	$y = 4.54 \cdot 10^4 + 282 x$	0.9998

Tabella 40: retta di calibrazione e coefficienti di correlazione dei retinoidi identificati nel latte crudo di *vaccino*.

Analiti	Transizione SRM più intensa	Equazione della retta $y = b_0 + b_1 x$	Coefficiente di correlazione R^2
Retinolo	269/119	$y = 1.46 \cdot 10^5 + 2.24 \cdot 10^4 x$	0.9998
Retinil linolenato	269/199	$y = 6.32 \cdot 10^4 + 456 x$	0.9999
Retinil linoleato	269/199	$y = 7.42 \cdot 10^4 + 2.76 \cdot 10^3 x$	0.9994
Retinil miristato	269/119	$y = 1.2 \cdot 10^4 + 270 x$	0.9998
Retinil oleato	269/119	$y = 8.0 \cdot 10^4 + 354 x$	0.9995
Retinil palmitato	269/119	$y = 4.81 \cdot 10^5 + 703 x$	0.9986
Retinil eptadecanoato	269/199	$y = 4.44 \cdot 10^4 + 799 x$	0.9999
Retinil stearato	269/119	$y = 3.15 \cdot 10^4 + 932 x$	0.9998

Tabella 41: retta di calibrazione e coefficienti di correlazione dei retinoidi identificati nel latte crudo di *bufala*.

Analiti	Transizione SRM più intensa	Equazione della retta $y = b_0 + b_1 x$	Coefficiente di correlazione R^2
Retinolo	269/119	$y = 1.51 \cdot 10^5 + 2.12 \cdot 10^4 x$	0.9986
Retinil linolenato	269/199	$y = 7.13 \cdot 10^4 + 212 x$	0.9941
Retinil linoleato	269/199	$y = 9.44 \cdot 10^4 + 1.88 \cdot 10^3 x$	0.9969
Retinil oleato	269/119	$y = 1.34 \cdot 10^5 + 378 x$	0.9978
Retinil palmitato	269/119	$y = 1.29 \cdot 10^4 + 550 x$	0.9988
Retinil eptadecanoato	269/199	$y = 3.56 \cdot 10^4 + 576 x$	0.9991
Retinil stearato	269/119	$y = 3.9 \cdot 10^4 + 2.3 \cdot 10^3 x$	0.9989

c. Recuperi e Precisione del metodo

Dopo una preliminare determinazione, mediante il metodo delle aggiunte standard, del contenuto naturale degli analiti nei campioni di latte selezionato, si procedeva alla valutazione del recupero, applicando il *metodo del surrogato* per **vitamine liposolubili e carotenoidi** ed il *metodo volumetrico* per i **retinil esteri**.

Per il *metodo del surrogato*, si fortificava un'aliquota di 6 mL con quantità note sia degli analiti che degli standard interni. In questo caso si valutava la capacità degli standard interni di compensare le perdite dovute alla fase preparativa.

Per il *metodo volumetrico*, invece, risulta necessaria la preparazione di un campione di controllo. Pertanto, si prelevavano 2 aliquote di latte da 6 mL ciascuna: la prima aliquota era fortificata con quantità note degli analiti e sottoposta al processo di estrazione; la seconda (campione di controllo) era estratta direttamente e la fortificazione era fatta sull'estratto al termine della procedura, prima dello step finale di evaporazione, con le stesse quantità nominali di analiti. Gli standard interni erano comunque addizionati prima dello step finale di evaporazione, allo scopo di correggere esclusivamente la risposta strumentale.

In entrambi i casi, i livelli di fortificazione sono stati scelti in modo da aumentare il contenuto originale di un fattore 2-3 (il più vicino possibile al valore endogeno); un livello arbitrario pari a circa due volte il LOQ è stato scelto per gli analiti che non erano rilevati. I campioni erano posti sotto agitazione per 30 minuti a temperatura ambiente e poi sottoposti alla procedura estrattiva.

Il recupero era calcolato per ciascun analita dalla media di sei repliche al livello di fortificazione applicato, mentre la corrispondente deviazione standard relativa (DSR) era rappresentativa della precisione intra-day.

Per **vitamine liposolubili e carotenoidi**, i recuperi erano superiori all'80% per tutti gli analiti, con l'eccezione dei vitameri K. Recuperi e precisione, conseguiti nel modo descritto, per il latte vaccino sono riportati in tabella 42 (in tabella 46 sono riassunti quelli per gli altri tipi di latte).

Nel caso dei **retinil esteri** i recuperi risultavano $\geq 68\%$ con una ripetibilità $\leq 10\%$; soltanto per il retinolo nel latte di bufala l'efficienza della procedura estrattiva si dimostrava inferiore (pari al 42%), ma comunque con una soddisfacente precisione intra-day (4%). In tabella 43 i risultati conseguiti.

La precisione inter-day era valutata come media di dodici repliche effettuate nell'arco di due settimane e risultava $\leq 20\%$ per tutti gli analiti. I metodi erano caratterizzati da una buona precisione (tabelle 42 e 44) con deviazioni standard relative lievemente più alte per carotenoidi e vitameri K, indipendentemente dal tipo di latte. I risultati conseguiti sono soddisfacenti, dal momento che il valore soglia di precisione accettato, lavorando con le vitamine, è pari al 20%.

Tabella 42: recuperi e precisione intra-day e inter-day delle vitamine liposolubili e dei carotenoidi nel latte crudo di **mucca**.

Analiti	Recuperi (%)	Precisione (RSD) (%)	
		<u>Intra-day</u>	<u>Inter-day</u>
Retinolo	100	7	13
α-tocoferolo	100	5	10
δ-tocoferolo	80	10	15
γ-tocoferolo	88	5	12
Ergocalciferolo	97	5	12
Colecalciferolo	99	6	10
Filloquinone	67	10	18
Menachinone-4	54	10	20
Luteina	100	9	12
Zeaxantina	80	9	15
β-criptoxantina	87	8	15
β-carotene	100	10	18

Tabella 43: recuperi percentuali (più deviazioni standard relative) dei retinoidi identificati nel latte crudo delle diverse specie animali. I recuperi sono stati calcolati applicando un livello di fortificazione tale da incrementare il livello endogeno di 2-3 volte .

Analiti	Recuperi % (precisione intra-day %)			
	<i>pecora</i>	<i>capra</i>	<i>mucca</i>	<i>bufala</i>
Retinolo	76 (5)	68 (2)	75 (3)	42 (4)
Retinil caprato	-	95 (4)	-	-
Retinil linolenato	101 (5)	91 (8)	94 (6)	87 (3)
Retinil linoleato	-	-	105 (7)	87 (9)
Retinil miristato	-	-	104 (10)	-
Retinil oleato	105 (5)	96 (7)	97 (8)	100 (6)
Retinil palmitato	95 (7)	91 (9)	110 (9)	91 (10)
Retinil eptadecanoato	102 (5)	92 (4)	92 (7)	72 (4)
Retinil stearato	106 (5)	104 (10)	109 (10)	82 (8)
Retinil eicosanoato	91 (9)	91 (5)	-	-

Tabella 44: precisione inter-day espressa come deviazione standard relativa calcolata applicando un livello di fortificazione tale da incrementare il livello endogeno di 2-3 volte.

Analiti	Precisione inter-day (%)			
	<i>pecora</i>	<i>capra</i>	<i>mucca</i>	<i>bufala</i>
Retinolo	(8)	(6)	(9)	(8)
Retinil caprato	-	(8)	-	-
Retinil linolenato	(4)	(12)	(11)	(8)
Retinil linoleato	-	-	(12)	(13)
Retinil miristato	-	-	(16)	-
Retinil oleato	(9)	(10)	(13)	(10)
Retinil palmitato	(7)	(14)	(15)	(16)
Retinil eptadecanoato	(4)	(9)	(11)	(8)
Retinil stearato	(10)	(13)	(14)	(11)
Retinil eicosanoato	(12)	(9)	-	-

d. Limiti di rilevabilità e di quantificazione

Il limite di rivelabilità (LOD, *Limit Of Detection*) e il limite di quantificazione (LOQ, *Limit Of Quantitation*) erano stimati usando la transizione SRM meno intensa (*qualifier transition*). In questo modo, infatti, entrambe le transizioni SRM possono essere osservate con il caratteristico

rapporto ionico riportato in tabella 19, rispettando i criteri di identificazione anche al livello del LOD.

Il LOD per ciascun analita era calcolato come la quantità di sostanza in grado di fornire un picco cromatografico 3 volte più intenso del rumore di fondo della linea di base di un cromatogramma di un campione di latte non fortificato ($S/N=3$), dopo aver stimato le quantità endogene presenti. Per gli analiti non osservati con la procedura estrattiva prescelta, si preparava un campione di controllo (simulata) e si stimava il LOD come la concentrazione di sostanza in grado di fornire un rapporto $S/N=3$. Il LOQ era calcolato come tre volte il LOD. I valori di LOD e LOQ erano stimati dalla media di sei repliche.

In tabella 45 sono riportati i limiti del metodo di **vitamine liposolubili** e **carotenoidi** estratti dal latte vaccino. Per gli altri tipi di latte, questi dati sono riassunti nella tabella 46. In tabella 47 sono riportati i limiti per i **retinoidi**.

Tabella 45: limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) per vitamine liposolubili e carotenoidi per i campioni di latte crudo di **mucca**.

Analiti	Transizione SRM meno intensa (qualifier)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
Retinolo	269/107	15.6	46.8
α-tocoferolo	430/205	3.70	11.10
δ-tocoferolo	402/137	3.13	9.40
γ-tocoferolo	416/191	3.24	9.72
Ergocalciferolo	397/107	0.90	2.70
Colecalciferolo	385/259	1.12	3.36
Filloquinone	445/81	2.21	6.63
Menachinone-4	451/199	1.7	5.10
Luteina	551/135	1.20	3.60
Zeaxantina	569/477	2.32	6.96
β-criptoxantina	553/135	1.85	5.55
β-carotene	537/119	7.41	22.2

Tabella 46: tabella riassuntiva dei parametri di convalida relativi al metodo di conferma di vitamine liposolubili e carotenoidi relativi ai campione di latte di *bufala*, *pecora*, *capra* e *asina*.

Latte	Analiti	Recuperi (%)	Precisione (RSD) (%)		Limiti del metodo ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Parametri regressione lineare	
			Intra-day	Inter-day	LOD	LOQ	Pendenza ($\times 10^4$)	Coefficienti di correlazione
<i>bufala</i>	Retinolo	100	7.0	12	16.2	48.6	3.32	0.9985
	α -tocoferolo	100	7.0	10	4.05	12.2	1.70	0.9978
	δ -tocoferolo	78	12	17	3.32	11.0	0.08	0.9953
	γ -tocoferolo	90	5.0	10	3.28	9.84	0.70	0.9980
	Ergocalciferolo	98	5.0	10	0.95	2.85	0.54	0.9988
	Colecalciferolo	98	7.0	10	1.12	3.36	1.30	0.9960
	Filloquinone	65	10	20	1.88	5.64	7.52	0.9988
	Menachinone-4	57	12	20	2.50	7.50	2.76	0.9989
	Luteina	98	10	15	1.29	3.87	1.00	0.9985
	Zeaxantina	78	10	15	2.38	7.14	0.35	0.9982
	β -criptoxantina	89	8.0	14	1.90	5.70	0.91	0.9960
	β -carotene	97	8.0	16	8.01	24.0	0.26	0.9967
<i>pecora</i>	Retinolo	100	5.0	10	16.0	48.0	3.27	0.9980
	α -tocoferolo	100	6.0	10	14.4	43.2	1.63	0.9975
	δ -tocoferolo	81	9.0	14	3.15	9.45	0.10	0.9952
	γ -tocoferolo	90	7.0	12	3.30	9.90	0.68	0.9978
	Ergocalciferolo	96	6.0	10	1.02	3.06	0.60	0.9991
	Colecalciferolo	98	5.0	9.0	1.15	3.96	1.35	0.9958
	Filloquinone	68	9.0	17	1.52	22.5	7.48	0.9990
	Menachinone-4	59	10	18	2.13	6.39	3.00	0.9985
	Luteina	98	9.0	14	1.22	3.66	1.13	0.9985
	Zeaxantina	81	9.0	14	2.38	7.14	0.30	0.9990
	β -criptoxantina	85	9.0	15	1.89	5.67	0.95	0.9958
	β -carotene	98	10	19	7.38	22.1	0.30	0.9970
<i>capra</i>	Retinolo	100	7.0	11	15.8	47.4	3.30	0.9975
	α -tocoferolo	100	5.0	9.0	15.3	45.9	1.71	0.9980
	δ -tocoferolo	82	10	15	3.15	9.45	0.12	0.9938
	γ -tocoferolo	91	5.0	10	3.23	9.69	0.62	0.9980
	Ergocalciferolo	95	6.0	10	0.98	2.94	0.63	0.9989
	Colecalciferolo	98	6.0	11	1.15	3.45	1.37	0.9955
	Filloquinone	67	12	20	1.72	5.16	7.60	0.9987
	Menachinone-4	57	12	20	2.26	6.78	2.82	0.9992
	Luteina	98	10	14	1.23	3.69	1.09	0.9977
	Zeaxantina	77	10	16	2.40	7.20	0.28	0.9983
	β -criptoxantina	86	10	15	1.90	5.70	0.95	0.9967
	β -carotene	98	12	18	7.35	22.1	0.29	0.9965
<i>asina</i>	Retinolo	99	5.0	10	10.3	30.9	3.50	0.9982
	α -tocoferolo	98	5.0	9.0	3.04	9.12	1.74	0.9970
	δ -tocoferolo	76	9.0	14	3.10	9.30	0.09	0.9953
	γ -tocoferolo	95	5.0	10	3.18	9.54	0.68	0.9981
	Ergocalciferolo	100	6.0	13	0.88	2.64	0.70	0.9985
	Colecalciferolo	100	5.0	12	1.05	3.15	1.38	0.9952
	Filloquinone	62	13	23	2.20	6.60	7.09	0.9986
	Menachinone-4	50	12	23	2.35	7.05	2.68	0.9980
	Luteina	97	12	18	1.18	3.54	0.99	0.9979
	Zeaxantina	75	10	16	2.40	7.20	0.30	0.9988
	β -criptoxantina	84	10	16	1.92	5.76	0.91	0.9965
	β -carotene	100	10	15	6.98	20.9	0.27	0.9968

Tabella 47: limiti di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) per i retinoidi identificati nel latte crudo delle diverse specie oggetto di studio.

Analiti	Transizione SRM meno intensa (qualifier)	pecora		capra		mucca		bufala	
		LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Retinolo	269/199	4	12	8	24	3	9	4	12
Retinil caprato	269/119	n.d. ^a	n.d.	7	21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Retinil linolenato	269/119	136	408	52	156	56	168	394	1182
Retinil linoleato ^a	269/119	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	29	87	47	141
Retinil miristato	269/199	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	65	195	n.d.	n.d.
Retinil oleato	269/199	178	534	121	363	110	330	97	291
Retinil palmitato	269/199	159	477	102	306	33	99	190	570
Retinil eptadecanoato	269/119	125	375	89	267	74	222	106	318
Retinil stearato	269/199	90	270	34	102	22	66	16	48
Retinil eicosanoato	269/93	596	1788	217	651	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^an.d., not detected.

2.4.3 SCREENING DI CAROTENOIDI MEDIANTE L'ACCOPIAMENTO HPLC-DAD-QqQ

Come precedentemente dimostrato attraverso lo studio di selettività, la corretta identificazione di ciascun analita target nel latte è stata assicurata attraverso una serie di criteri che hanno evitato, in questo studio, di incorrere in erronee quantificazioni.

L'identificazione di altri carotenoidi, i cui standard non sono disponibili o estremamente costosi, era supportata dal tempo di ritenzione atteso e dallo spettro di assorbimento UV-Vis, in accordo ai parametri descritti nel paragrafo 2.1.7. Inoltre, un ulteriore elemento corroborante l'identificazione di isomeri geometrici e strutturali dei quattro carotenoidi target era la condivisione delle loro transizioni SRM. In figura 50 è riportato il cromatogramma LC-DAD di un estratto di latte crudo vaccino, mentre in tabella 48 sono riassunti i risultati dello screening ottenuti tramite l'ifenzione HPLC-DAD-tandem MS.

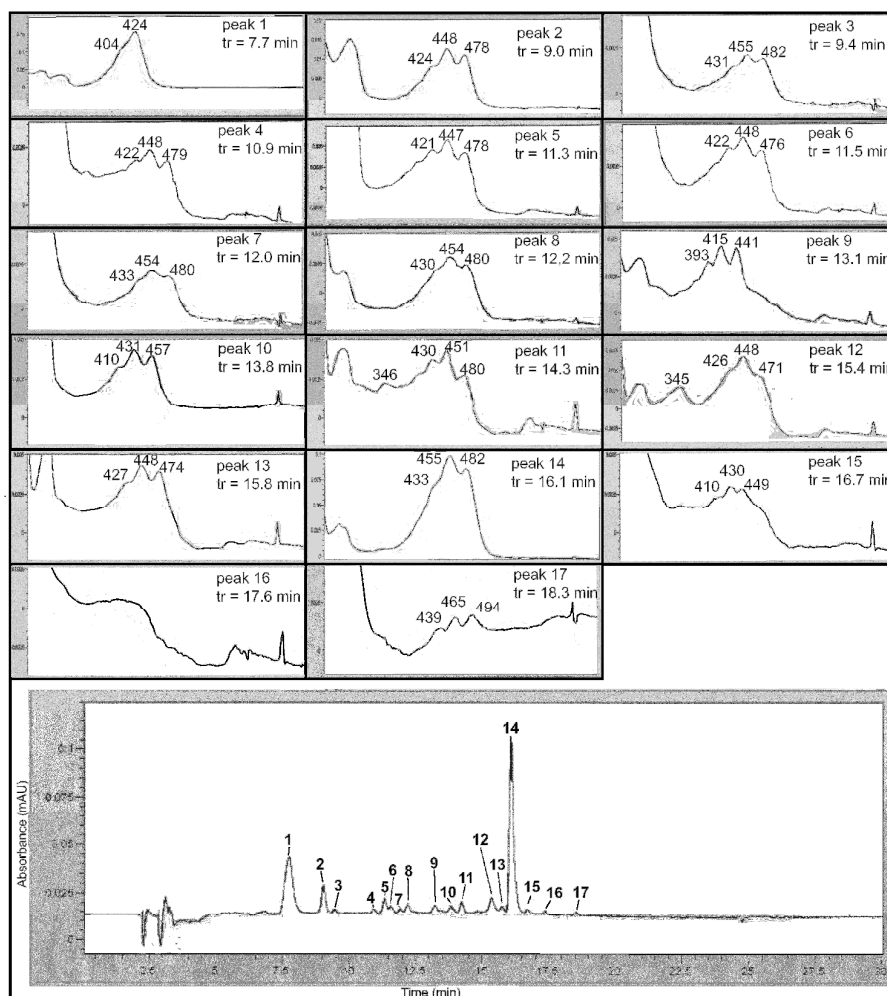


Figura 50: Cromatogramma LC-DAD di un estratto di latte bovino; per ciascun picco cromatografico è mostrato il corrispondente spettro UV-Vis acquisito tra 200 e 700 nm. I picchi numerati sono stati identificati come mostrato in tabella 48.

Tabella 48: Parametri LC-UV-Vis-MS/MS per l'identificazione dei carotenoidi nel latte vaccino

Picco no.	Tempo di		Carotenoide	Transizioni SRM (m/z)	λ_{\max} Calcolata ^b (nm)	λ Osservata ^c (nm)	λ Riportata (nm)	Valori trovati		Riportati	
	LC-DAD	LC-MS						%(III/II)	Q-ratio	%(III/II)	Q-ratio
1	7.71	-	unknown 1	-	-	404, 424	-	-	-	-	-
2	9.01	9.27	all-trans-luteina	551.4/135.2	448	424, 448, 478	422, 445, 47435	60	-	6035	-
3	9.44	9.70	all-trans- zeaxantina	569.4/477.2 551.4/135.2	453	431, 455, 482	428, 450, 47835	25	-	2535	-
4	10.88	11.14	all-trans-zeinoxantina	553.5/119.1	448	422, 448, 479	420, 444, 47235	58	55	6035	-
5	11.31	11.56	all-trans- α -criptoxantina	553.5/135.1 553.5/119.1	448	421, 447, 478	423, 446, 47335	60	-	6035	-
6	11.54	11.80	cis- α -criptoxantina	553.5/135.1	446-442	422, 448, 476	-	55	-	-	-
7	11.95	-	unknown 2	-	-	433, 454, 480	-	23	-	-	-
8	12.15	12.41	all-trans- β -criptoxantina	553.5/135.1 553.5/119.1	453	430, 454, 480	425, 454, 47844	23	-	2535	-
9	13.09	-	unknown 3	-	-	393, 415, 441	-	86	-	-	-
10	13.77	14.04	all-trans-3-idrossi- β -zeacarotene	* ^d	432	410, 431, 457	405, 428, 45335	33	-	-	-
11	14.28	14.54	cis- β -carotene	537.5/119.1	-	346, 430, 451, 480	-	21	-	-	-
12	15.40	15.67	13-cis- β -carotene	537.5/119.1	451-447	345, 426, 448, 471	338, 449, 47845	5	2.6	745	2.346 ^e
13	15.75	16.01	all-trans- α -carotene	537.5/119.1	447	427, 448, 474	422, 445, 47335	60	-	6035	-
14	16.13	16.39	all-trans- β -carotene	537.5/119.1	453	433, 455, 482	450, 47835	23	-	2535	-
15	16.69	16.95	all-trans- β -zeacarotene	* ^d	432	410, 430, 449	402, 428, 45347	60	-	6247	-
16	17.63	17.88	unknown 4	537.5/119.1	-	low intense	-	-	-	-	-
17	18.30	18.56	all-trans- γ -carotene	537.5/119.1	465	439, 465, 494	437, 462, 49435	38	-	4035	-

^a I tempi di ritenzione registrati sul cromatogramma LC-DAD erano anticipate di circa 0.26 min rispetto a quelli corrispondenti, osservati sul cromatogramma LC-MS/MS.

^b La regola di Fieser [104] era applicata per il calcolo della λ_{\max} (λ_{II}) della forma all-*trans* dei carotenoidi trovati nel latte di mucca; $\lambda_{\max} = 114 + 5 M + n (48 - 1.7n) - 16.5 R_{\text{endo}} - 10 R_{\text{exo}}$, dove n = numero dei doppi legami coniugati, M = numero dei sostituenti alchilici o tipo-alchilici sul sistema coniugato, R_{endo} = numero degli anelli con doppi legami endociclici nei sistemi coniugati, R_{exo} = numero degli anelli con legami esociclici. La presenza di gruppi ossidrilici nelle molecole non influenza il valore di λ_{\max} . Per gli isomeri *cis*, il valore di λ_{\max} era stimato sottraendo al valore teorico della forma all-*trans*: 2-6 nm per l'isomero mono-*cis* (decremento maggiore quando il doppio legame *cis* si avvicina al centro del sistema coniugato), 10 nm per l'isomero di-*cis* e 50 nm per il poli-*cis*.

^c È noto che il solvente influenza [108, 109] sia la λ_{\max} che la struttura fine dello spettro, ma per ogni carotenoide il valore di λ_{\max} risulta simile in etere di petrolio, esano, dietil etere, metanolo, etanolo e aceto nitrile. In questo lavoro, gli spettri UV-Vis dei carotenoidi erano estratti dai cromatogrammi HPLC-DAD, acquisiti lavorando in gradiente; dal momento che i solventi utilizzati erano metanolo, isopropanolo e esano, i valori di λ_{\max} osservati risultavano molto vicini a quelli calcolati attraverso la regola di Fieser.

^d Nonostante la sottile differenza di massa, sia il 3-idrossi- β -zeacarotene che il β -zeacarotene rispondevano alle transizioni SRM di β -criptoxantina e β -carotene rispettivamente. Questo potrebbe essere giustificato considerando che il triplo quadrupolo lavora in modalità di risoluzione unitaria (0.7 ± 0.1 u) e che i carotenoidi possono generare specie ioniche come $[M-H]^+$, oltre a $[M]^{++}$ e $[M+H]^+$.

^e Viene riportato il valore $1/Q_{\text{ratio}}$, dal momento che gli autori hanno calcolato il Q_{ratio} come (B/II)%.

2.4.4 CARATTERIZZAZIONE DEL LATTE CRUDO PER LE DIVERSE SPECIE ANIMALI

L'approccio analitico sviluppato è stato applicato per caratterizzare il latte crudo vaccino, bufalino, ovino e caprino in termini di vitamine liposolubili, carotenoidi e retinoidi, il latte asinino in termini di vitamine liposolubili e carotenoidi

a. Risultati dell'analisi quantitativa per vitamine liposolubili e carotenoidi

I risultati quantitativi, riassunti in tabella 49, sono correlati all'analisi di un limitato numero di campioni; questo significa che tali dati devono essere considerati come un profilo, dal momento che fattori di variabilità quali stagione, stadio di lattazione, stato di salute e variabilità individuale non sono stati presi in considerazione in questo studio.

Tabella 49: Risultati ottenuti^a espressi in $\mu\text{g L}^{-1}$ dei vari analiti target oggetto di studio per i diversi tipi di latte analizzato.

Analiti		Mucca	Bufala	Pecora	Capra	Asina
		$(\mu\text{g L}^{-1})$				
Vitamina A	retinolo	2100	2870	4323	4317	586
Provitamina A	β -carotene	243	n.d. ^b	n.d.	n.d.	n.d.
	β -criptoxantina	7.01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Carotenoidi non-provitamina A	luteina	10.0	n.d.	9.87	<LOQ	n.d.
	zeaxantina	<LOQ	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.
Vitamina E	α -tocoferolo	3780	1210	3048	6545	807
	γ -tocoferolo	38.1	188	208	384	260
	δ -tocoferolo	n.d.	n.d.	<LOQ	<LOQ	n.d.
Vitamina D	ergocalciferolo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	colecalfiferolo	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
Vitamina K	fillochinone	8.82	5.49	97.9	<LOQ	n.d.
	menachinone-4	8.60	n.d.	17.4	n.d.	n.d.

^a Tutti i dati sono espressi come medie aritmetiche di tre repliche.

^b n.d., not detected; con questa notazione si intende dire che la transizione SRM meno intensa o entrambe le transizioni SRM non erano rivelate.

I risultati dell'analisi quantitativa hanno dimostrato che in generale il latte non solo è una buona sorgente di vitamina A ma anche e soprattutto di vitamina E. Inoltre, a causa del sistema di allevamento basato sulla pastura per gli animali da cui sono stati ottenuti i campioni, dell'assenza di trattamenti termici e dell'immediata analisi dopo il campionamento,

i campioni di latte analizzati in questo studio risultavano particolarmente ricchi in queste due vitamine. Infatti, abbiamo verificato che per il latte vaccino intero pastorizzato della grande distribuzione, la concentrazione di retinolo variava tra 400 and 1900 $\mu\text{g L}^{-1}$, mentre quella dell' α -tocoferolo tra 600 and 1280 $\mu\text{g L}^{-1}$. Il latte d'asina, probabilmente a causa del basso contenuto in grassi, risultava il più povero in questi micronutrienti liposolubili.

Per quanto riguarda la vitamina A e i carotenoidi i risultati dell'analisi quantitativa hanno mostrato che il latte dei piccoli ruminanti (pecora e capra) ne è ricchissimo. Tra i ruminanti, il latte di mucca ha il contenuto più basso ma è il solo a mostrare la presenza di β -carotene in quantità significative e una varietà di carotenoidi (vedi figura 50) assenti negli altri tipi di latte, fatta eccezione per luteina e zeaxantina. Analizziamo, a tale proposito, i risultati riportati nella tabella 48. L'incognito 1 con un massimo d'assorbimento a 422-424 nm, caratteristico della banda di Soret, è stato attribuito a un prodotto di degradazione della clorofilla a, generato nel rumine dei bovini. Il picco 4 è stato assegnato alla zeinoxantina, carotenolo presente nei petali di alcuni fiori insieme a all-*trans*- α - e β -criptoxantina (picchi 5 e 8). I dati MS/MS e UV-Vis permettevano di identificare il picco 6 come *cis*- α -criptoxantina, ma non il picco 7 a causa dei bassi segnali di entrambi i detectors. Nonostante il caratteristico spettro UV-Vis estratto dal picco 9 (vedi figura 50), non è stato possibile formulare nessuna identificazione a causa di assenza di dati mass-spettrometrici. I picchi 10 e 15 sono stati assegnati al 3-idrossi- β -zeacarotene e β -zeacarotene, rispettivamente, sulla base del matching degli spettri UV-Vis (il gruppo OH non influenza l'assorbimento del cromoforo), dei tempi di ritenzione aspettati e della condivisione delle transizioni SRM dei carotenodi target. In effetti, estraendo le correnti ioniche del all-*trans*- β -carotene dal cromatogramma LC-SRM relativo all'analisi del latte vaccino (figura 51), erano osservati altri 6 picchi i cui spettri UV-Vis permettevano l'identificazione di *cis*- β -carotene, 13-*cis*- β -carotene, all-*trans*- α -carotene, all-*trans*- β -zeacarotene e all-*trans*- γ -carotene. Il picco 16 rimaneva incognito per i bassi segnali UV-Vis.

È noto che i carotenoidi modificano le proprietà nutrizionali e organolettiche del latte bovino [17], contribuendo ad un colore giallastro e ad una stabilità ossidativa garantita anche da altri antiossidanti come lattoferrina, vitamina C e vitamina E. È un dato di fatto, che il latte bovino analizzato in questo lavoro mostrava un colore giallo-verde, mentre gli altri tipi di latte erano bianchi, essendo quasi privi di questi pigmenti. La letteratura [17] spiega queste differenze tra le specie come un fatto dovuto ad una maggiore efficienza nella conversione del β -carotene in retinolo da parte degli enterociti degli ovini rispetto a quelli dei bovini. Tuttavia, la loro concentrazione nel latte dipende anche dalla natura, dalla quantità di foraggio consumato e dalle variazioni relative alla stagione (per esempio, l'esposizione alla luce solare diminuisce la

loro concentrazione nell'erba perché fotosensibili). I nostri campioni erano raccolti ad Aprile 2012 e la distribuzione dei carotenoidi trovata nel latte vaccino analizzato era consistente con quella misurata da Chauveau-Duriot et al. [2] nei foraggi, dove la luteina ($230 \mu\text{g g}^{-1}$) è il carotenode più abbondante, seguito da all-*trans*- β -carotene ($60 \mu\text{g g}^{-1}$), zeaxantina ($19 \mu\text{g g}^{-1}$), neoxantina ($18 \mu\text{g g}^{-1}$), 9-*cis*- β -carotene ($10 \mu\text{g g}^{-1}$), 13-*cis*- β -carotene ($8 \mu\text{g g}^{-1}$) e violaxantina ($6 \mu\text{g g}^{-1}$); α -carotene e β -criptoxantina erano rivelati da altri autori ma non quantificati [110].

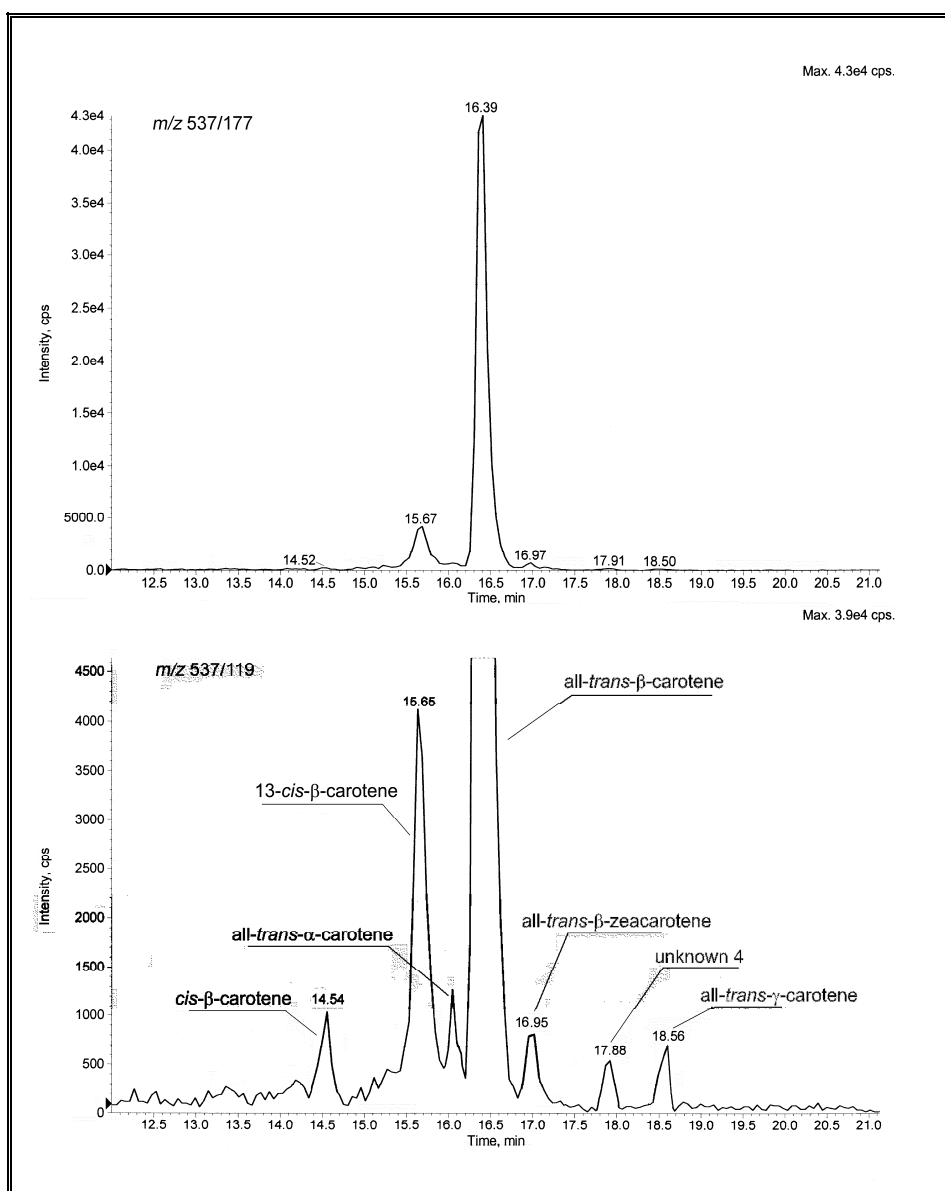


Figura 51: Correnti ioniche del all-*trans*- β -carotene dal cromatogramma LC-SRM relativo all'analisi del latte vaccino.

Per quanto riguarda la vitamina E, come descritto in letteratura la sola forma trovata nei foraggi è l' α -tocoferolo; questa è stata anche la forma vitaminica più abbondante in assoluto

nei diversi tipi di latte, addirittura più della vitamina A, con la sola eccezione del latte di bufala. Il γ -tocoferolo è presente in minor quantità, specialmente nel latte di mucca, mentre l'omologo δ è stato trovato solo nel latte dei piccoli ruminanti.

È importante sottolineare che quando le correnti ioniche del γ -tocoferolo erano estratte dal cromatogramma LC-SRM (figura 22), erano evidenti due picchi: il primo a $t = 9,63 \text{ min}$ (forma γ) e il secondo a $t = 10,05 \text{ min}$, quest'ultimo potrebbe essere impropriamente attribuito al β -tocoferolo, un isomero della forma γ . In realtà esso è ascrivibile all' α -tocoferolo, che, perdendo un gruppo $-\text{CH}_3$ nella sorgente APCI, genera uno ione frammento con lo stesso rapporto m/z dello ione pseudomolecolare del γ -tocoferolo; inoltre, la corrispondenza con il tempo di ritenzione della forma α è perfetta. Questa corrente ionica è stata osservata con un'intensità apprezzabile analizzando i soli estratti di latte bovino e caprino a causa dell'elevata concentrazione di α -tocoferolo.

La concentrazione di colecalciferolo nel latte dipende dall'esposizione dell'animale alla luce solare, mentre la presenza di ergocalciferolo è influenzata dall'assunzione di foraggio essiccato (fieno). La letteratura [9, 111, 112, 113] fornisce indicazioni molto diverse sulla concentrazione di vitamina D3 nel latte vaccino, da 10^{-3} a $2 \mu\text{g L}^{-1}$. Nonostante i bassi limiti conseguiti, i vitameri D non sono stati mai rilevati nel latte di mucca, nonostante il latte sia stato prodotto da animali allevati liberi al pascolo e quindi costantemente esposti alla luce solare durante il giorno. Evidentemente, le loro concentrazioni endogene sono più basse dei limiti stimati; in effetti, alcuni autori potevano quantificare la vitamina D3 nel latte di mucca solo dopo preconcentrazione del digerito su una colonna semi-preparativa [112, 113]. Comunque, le nostre analisi hanno rilevato D3 e D2 nel latte di bufala, mentre tracce di entrambi i vitameri erano trovate nel latte di capra e d'asina, ma la loro presenza non poteva essere confermata perché era osservata solo la transizione SRM più intensa.

In letteratura non ci sono molte informazioni inerenti la distribuzione naturale dei vitameri K e, quando disponibili, si riferiscono al solo fillochinone. Indyk estraeva fillochinone e menachinone-4 dal latte vaccino pastorizzato mediante digestione enzimatica con lipasi, trovando valori tra 1 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ per entrambi gli omologhi [58]. Altri omologhi K trovati nel latte vaccino erano i menachinoni da MK-4 a MK-9; tuttavia, in questo lavoro l'applicazione degli stringenti criteri identificativi descritti consentiva di escludere la presenza di menachinone-7 (MK-7), il cui standard era purificato da un integratore alimentare disponibile in farmacia. Le nostre analisi hanno fornito valori analoghi a quelli di Indyk nel latte vaccino; inoltre, hanno mostrato che il latte di pecora è un'ottima sorgente sia di K1 che MK-4.

b. Risultati dell'analisi quantitativa per i retinoidi

Le concentrazioni stimate con il metodo delle aggiunte standard per i retinoidi identificati nel latte crudo delle specie di ruminanti in esame sono riportate in tabella 50.

Tabella 50: risultati dell'analisi quantitativa condotta sul latte crudo delle specie animali selezionate per questo lavoro di tesi.

Analita	<i>pecora</i>	<i>capra</i>	<i>mucca</i>	<i>bufala</i>
	$\mu\text{g/L}$			
Retinolo	30	42	37	71
Retinil caprato	n.d. ^a	36	n.d.	n.d.
Retinil linolenato	773	365	260	1706
Retinil linoleato	n.d.	n.d.	117	252
Retinil miristato	n.d.	n.d.	216	n.d.
Retinil oleato	1424	1212	993	842
Retinil palmitato	1587	1161	1032	1772
Retinil eptadecanoato	1706	1161	273	388
Retinil stearato	419	171	155	95
Retinil eicosanoato	2185	866	n.d.	n.d.

^an.d., not detected.

Per valutare il contenuto totale di vitamina A è stato necessario trasformare le concentrazioni, espresse in $\mu\text{g/L}$, in eq/L ; sulla base di questa trasformazione il retinolo totale nei diversi tipi di latte analizzati è riportato in tabella 51.

Tabella 51: retinolo totale nel latte crudo delle specie animali in esame.

	<i>pecora</i>	<i>capra</i>	<i>mucca</i>	<i>bufala</i>
Retinolo totale ($\mu\text{eq/L}$)	15	9	6	10

Nei cromatogrammi SRM riportati in figura 52 e 53 vengono mostrati i retinoidi endogeni identificati nel latte crudo delle diverse specie animali in esame, con entrambi gli accoppiamenti di colonne cromatografiche selezionati.

Da un punto di vista qualitativo, i risultati conseguiti evidenziavano la presenza di:

- 6 retinoidi comuni ai quattro tipi di latte: retinolo, retinil linolenato, retinil oleato, retinil palmitato, retinil eptadecanoato e retinil stearato;
- 1 retinoide comune al latte di pecora e di capra: retinil eicosanoato;

- 1 retinoide comune al latte di mucca e di bufala: retinil linoleato;
- 1 retinoide caratteristico del latte di capra: retinil caprato;
- 1 retinoide caratteristico del latte vaccino: retinil miristato.

Da un punto di vista quantitativo, si osservavano ulteriori differenze tra i campioni di latte analizzati. Il latte di bufala si diversificava per la maggior concentrazione di retinolo libero, che risultava circa il doppio rispetto a quella degli altri campioni. Un'altra caratteristica distintiva del latte bufalino è risultata l'elevata quantità di retinil linolenato, circa 2 volte più elevata rispetto al latte ovino e, addirittura, circa 7 volte rispetto a quello vaccino. Inoltre, era riscontrato un contenuto di retinil palmitato superiore a quello dei campioni delle altre specie, ma considerevole era anche la concentrazione trovata nel latte di pecora. Nel latte di pecora e di capra il contenuto di retinil eptadecanoato era da 4 a 6 volte maggiore rispetto a quello vaccino e bufalino.

Sulla base della concentrazione totale di retinolo espressa in $\mu\text{g/L}$ (tabella 51), il latte più ricco di vitamina A risultava quello di pecora, mentre più povero quello di mucca; contenuti analoghi e intermedi erano dati dal latte di capra e di bufala. Questi dati non concordano con quelli della letteratura che riportano una quantità di vitamina A analoga per latte vaccino e ovino e maggiore per quello caprino. Applicando la procedura della saponificazione, la quantità di vitamina A, stimata come retinolo libero, risultava inferiore (del 50% circa) a quella calcolata con la procedura sviluppata, nonostante l'idrolisi risultasse completa vista l'assenza nei cromatogrammi degli estratti dei picchi dei retinil esteri identificati in ciascun tipo di latte analizzato. Il confronto, fatto in termini di equivalenti, nel caso del latte crudo di pecora, ad esempio, mostrava con la procedura della saponificazione una concentrazione di retinolo di $7 \mu\text{g/L}$ contro i $15 \mu\text{g/L}$ stimati con l'estrazione diretta sviluppata in questo lavoro di tesi. Probabilmente, l'estrazione in ambiente alcalino, anche se condotta in condizioni blande (per tutta la notte a temperatura ambiente), libera retinolo, forma più facilmente soggetta a degradazione per esposizione a luce, calore e aria rispetto ai retinil esteri.

Il retinil palmitato era il vitamero A prevalente nel latte di mucca e di bufala, confermando quanto riportato in letteratura per il latte vaccino [8]; tuttavia, nel latte di pecora e di capra, la forma più abbondante era il retinil eicosanoato e il retinil oleato, rispettivamente.

L'ordine di abbondanza dei vitameri, nei diversi tipi di latte, è risultato il seguente:

- latte ovino: retinil eicosanoato > retinil eptadecanoato > retinil palmitato > retinil oleato > retinil linolenato > retinil stearato > retinolo;

- latte caprino: retinil oleato > retinil eptadecanoato = retinil palmitato > retinil eicosanoato > retinil linolenato > retinil stearato > retinolo > retinil caprato;
- latte vaccino: retinil palmitato > retinil oleato > retinil eptadecanoato \cong retinil linolenato > retinil stearato > retinil miristato > retinil linoleato > retinolo;
- latte bufalino: retinil palmitato > retinil linolenato > retinil oleato > retinil eptadecanoato > retinil linoleato > retinil stearato > retinolo.

Diversamente da quanto verificato in questo lavoro di tesi, Indyk [8] trovava retinil caprato nel latte vaccino ma non in quello di capra; risultato anomalo, considerando che l'acido caprinico o caprico è particolarmente abbondante in quest'ultimo tipo di latte. Indyk trovava anche retinil laurato, retinil pentadecanoato e retinil palmitoleato sia nel latte vaccino che caprino; così come il retinil miristato nel latte di capra. Inoltre, il retinil palmitato seguito dal retinil oleato risultavano in assoluto i vitameri A più abbondanti, il che non concorda con quanto da noi verificato.

I principali acidi grassi nel latte delle quattro specie selezionate sono:

palmitico (C16:0) > oleico (C18:1) > miristico (C14:0) = stearico (C18:0) > linoleico (C18:2) = linolenico (C18:3) > eicosanoico (C20:0).

Confrontando la distribuzione dei retinil esteri, trovati in questo lavoro, e la distribuzione degli acidi grassi dei trigliceridi, effettivamente si osserva una concordanza per quanto riguarda i composti dell'acido palmitico e dell'acido oleico.

La composizione in acidi grassi dei lipidi di membrana vegetali (e quindi dei foraggi) è relativamente semplice in quanto solo 6 acidi grassi contribuiscono per oltre il 90% del totale. Il 60% è costituito dall'acido linolenico (18:3 c9, 12, 15), mentre il restante 40% è costituito dal palmitico (16:0), il *trans*- Δ^3 -esadecenoico (16:1 t3), l'oleico (18:1 c9) e il linoleico (18:2 c9, 12). Sebbene l'acido linolenico risulti dominante nel foraggio, la letteratura riporta un basso contenuto di questo acido nel latte vaccino. La ragione è stata trovata nella bioidrogenazione, promossa dalla flora batterica del rumine, dell'acido linolenico ad acido vaccenico, che a sua volta nella ghiandola mammaria subirebbe una Δ^9 -desaturazione portando all'acido rumenico.

L'elevata quantità di retinil linolenato trovato nel latte di bufala sembrerebbe confortata dalla quantità di tale acido (sottoforma di gliceride) presente nei foraggi e dalla minore attività del rumine delle bufale rispetto a quello delle mucche, delle pecore e delle capre. Questo riscontro conferisce al latte di bufala un pregio nutrizionale, infatti gli omega-3 sono una categoria di acidi grassi essenziali, indispensabili per il corretto funzionamento dell'organismo. Sono noti soprattutto per la loro presenza ed il mantenimento dell'integrità delle membrane cellulari.

Talvolta sono raggruppati come vitamina F (dall'inglese *Fatty acids*). Il risultato conseguito risulta in accordo con altri studi, condotti recentemente dalla Società Scientifica di Nutrizione Vegetariana, che hanno dimostrato come ricollegare la presenza di omega-3 al pesce sia erroneo, il pesce contiene solo una parte degli acidi grassi essenziali ed in quantità quasi inesistenti, invece il mondo vegetale, soprattutto frutta secca, semi, oli vegetali (lino, canapa ecc.) ne sono molto ricchi coprendo lo spettro completo della famiglia Omega (omega-3, omega-6, omega-9).

Considerando gli acidi grassi monoinsaturi, il latte di bufala contiene minori quantità di acido oleico (C18:1 c9), trovando corrispondenza con la minor quantità di retinil oleato trovato rispetto alle altre specie.

L'analisi degli estratti dei quattro tipi di latte in esame effettuata con il rivelatore UV-vis a serie di diodi (325 nm), accoppiato on-line con il sistema LC-MS, non consentiva di ottenere ulteriori informazioni rispetto a quelle già evidenziate dal rivelatore mass spettrometrico, neppure per il solo aspetto qualitativo. La scarsa sensibilità del rivelatore UV-vis permetteva, infatti, una chiara identificazione soltanto per retinil oleato e retinil palmitato, individuati sia sulla base dei tempi di ritenzione cromatografici che degli spettri di assorbimento.

Come già detto nel paragrafo 2.1.5, con l'accoppiamento di colonne C₁₈/C₃₀ (TSKgel Super-ODS+ Prontosil C₃₀) rimaneva irrisolta la non completa separazione di retinil palmitoleato e retinil linoleato. Nel latte vaccino e bufalino sembrerebbe presente il solo retinil linoleato (picco simmetrico e assenza di spalle), la cui identificazione era basata sul tempo di ritenzione e sulla valutazione delle abbondanze relative delle due transizioni.

Per quanto riguarda il retinolo, mentre in solvente, come già descritto nel paragrafo 2.3.4, a causa del trattamento termico a 30 °C si verificava l'isomerizzazione *trans-cis*, negli estratti ciò non accadeva sempre. Non sembra esserci alcuna correlazione, tuttavia, tra il verificarsi dell'isomerizzazione e la matrice analizzata, infatti, per tutti e quattro i tipi di latte analizzati a volte è stata osservata la presenza dei due picchi riconducibili ai due isomeri geometrici del retinolo mediante l'utilizzo del sistema tandem di colonne C₁₈/C₁₈ (l'altro sistema di colonne non è in grado di separare i due isomeri), a volte no (figura 52).

Nei casi in cui si osservava l'isomerizzazione del retinolo, si verificava la similitudine tra quantità stimata con l'accoppiamento C₃₀/C₁₈ e quantità stimata con l'accoppiamento C₁₈/C₁₈, ottenuta costruendo la retta di calibrazione con la somma delle aree dei due picchi riconducibili ai due isomeri geometrici.

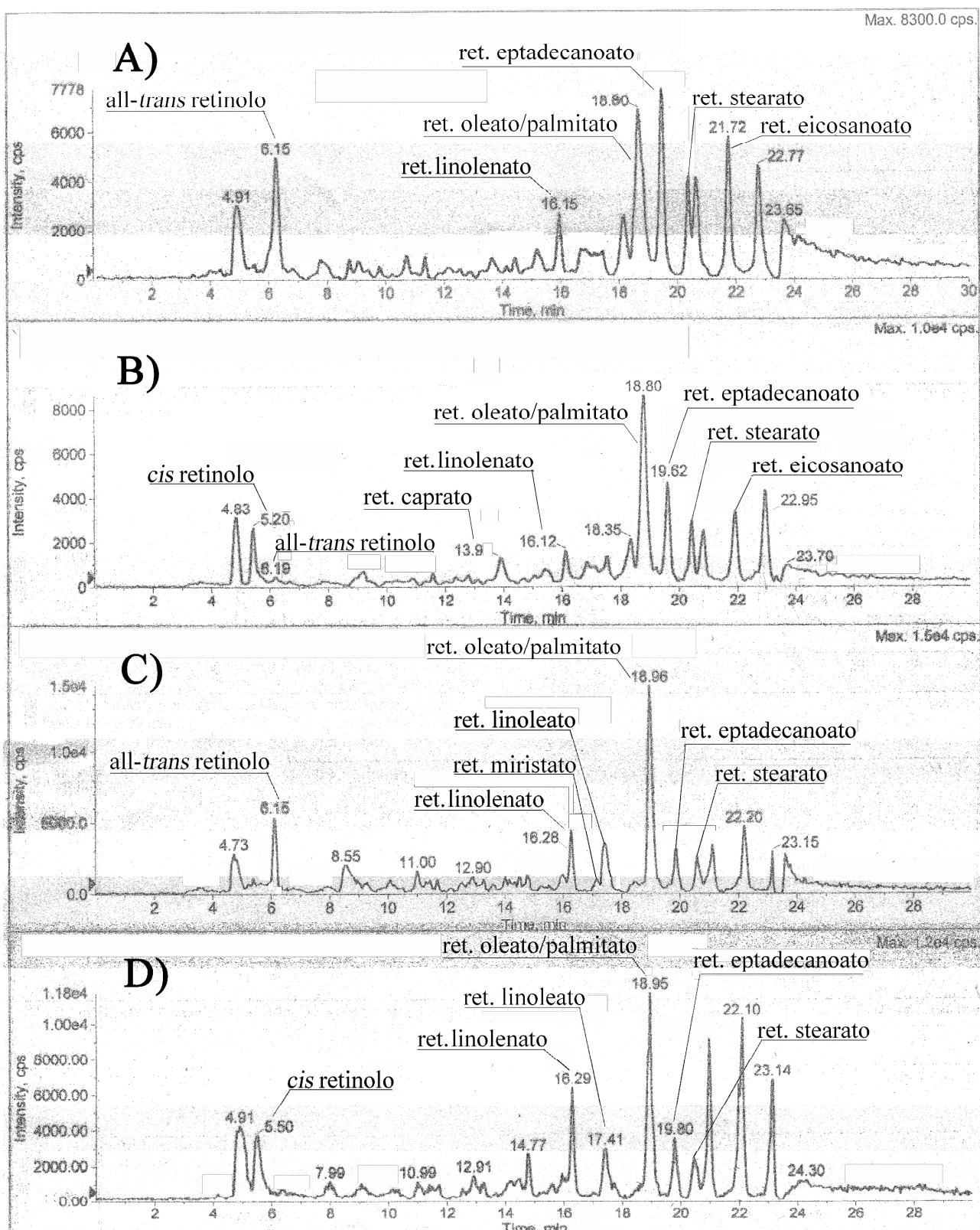


Figura 52: cromatogrammi SRM (corrente ionica 269/119 m/z) su sistema tandem di colonne SupelcosilTM C_{18} + Alltima C_{18} , relativi agli estratti ottenuti dal latte crudo delle diverse specie animali oggetto di studio: **A) pecora**, **B) capra**, **C) mucca**, **D) bufala**.

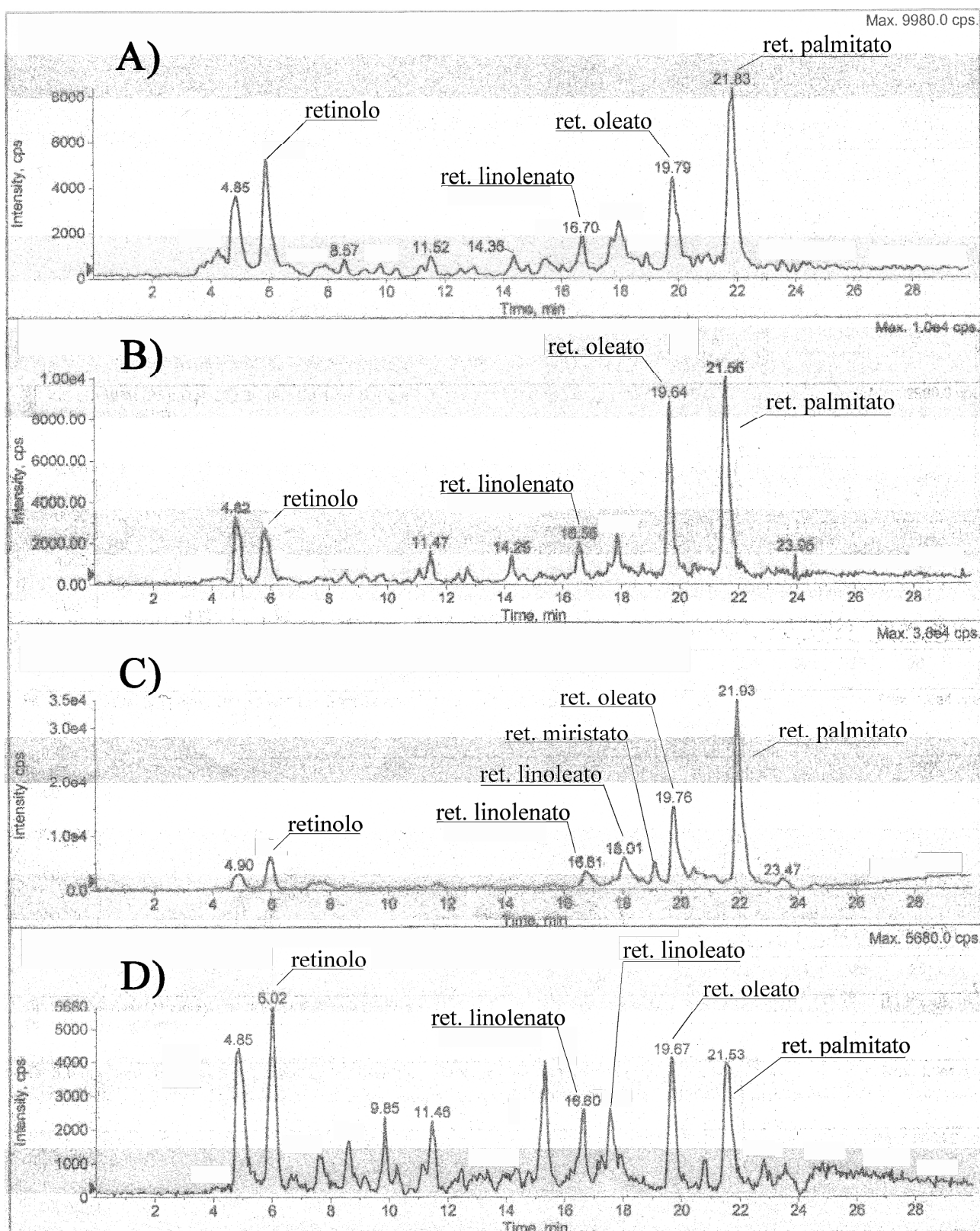


Figura 53: cromatogrammi SRM (corrente ionica 269/119 m/z) su sistema tandem di colonne TSKgel Super-ODS + ProntoSIL C₃₀, relativi agli estratti ottenuti dal latte crudo delle diverse specie animali oggetto di studio: **A) pecora**, **B) capra**, **C) mucca**, **D) bufala**.

3. CONCLUSIONI

La foodomica è stata recentemente definita come una nuova disciplina che studia alimenti e nutrizione attraverso delle strategie analitiche avanzate in cui l'ifenzione con le tecniche mass spettrometriche gioca un ruolo cruciale. Applicazioni della foodomica includono genomica, proteomica, metabolomica e più recentemente la lipidomica. La strategia sviluppata in questo lavoro di dottorato è stata basata sull'ifenzione LC-MS e LC-DAD-MS per definire il dettagliato profilo dei micronutrienti lipofilici in alimenti d'interesse, aprendo la strada a quella che potrebbe essere definita "micronutrinomica" o "vitaminomica".

In generale, la determinazione delle vitamine liposolubili e dei carotenoidi è un complesso problema analitico, specialmente quando rivolto all'analisi di campioni biologici e alimenti. Dal canto suo, il latte è una matrice singolare: fluido biologico e alimento, al contempo, con le caratteristiche di tre fasi chimiche, emulsione, sospensione colloidale e soluzione. Come alimento esso presenta un'ulteriore peculiarità, quella di essere un alimento completo, contenente tutti i gruppi vitaminici in diverse proporzioni.

Il latte vaccino è una delle matrici più investigate, soprattutto per ciò che riguarda i suoi macronutrienti, mentre la caratterizzazione del suo profilo vitaminico e carotenoidico risulta ancora incompleta e, ancor di più quella del latte prodotto da altri erbivori.

Il motivo di una tale carenza di informazioni è dovuta ad una serie di difficoltà riassumibili nei seguenti punti fondamentali:

- i) eterogeneità chimica che richiede specifici parametri di rivelazione;
- ii) presenza di vitameri e isomeri geometrici difficili da separare e identificare;
- iii) differenti stabilità, livelli di concentrazione, complessità delle matrici e possibilità di creare artefatti, tutti fattori che rendono critico lo step di estrazione;
- iv) elevato contenuto di grassi in alimenti di origine animale che, se non efficientemente rimossi, possono diminuire l'efficienza del recupero, della separazione cromatografia e il tempo di vita medio della colonna;
- v) presenza di vitamine liposolubili e carotenoli come forme legate, per esempio esterificate con acidi grassi, che sono difficili da separare, identificare e quantificare a causa della indisponibilità degli standards;
- vi) scarsa selettività delle tecniche d'analisi.

L'approccio sviluppato, applicato al latte prodotto da diverse specie erbivore, ha permesso di identificare complessivamente 34 analiti, tra forme vitaminiche e carotenoidi, e di quantificarne simultaneamente 20.

L'alta sensibilità e selettività del metodo ha permesso di ottenere una dettagliata composizione in termini di micronutrienti lipofilici per i diversi tipi di latte analizzati, fornendo dati che completano preesistenti informazioni sul latte vaccino e ne forniscono di nuove per gli altri tipi di latte.

In particolare, il metodo sviluppato e validato per i retinoidi, rispetto a l'unico preesistente [8], presenta due punti di forza importanti:

- 1) una maggiore certezza nell'identificazione degli analiti in una matrice complessa e ricca d'interferenti qual è il latte; infatti, l'identificazione era basata sul tempo di ritenzione, su due correnti ioniche che, anche se non specifiche, presentavano delle abbondanze relative analita-dipendenti.
- 2) Separazione cromatografica di tutti i vitameri A.

Questo lavoro non ha preso in considerazione la dipendenza dei profili vitaminici e carotenoidi da parametri di variabilità quali stagione, stadio di lattazione, e variabilità intra e inter-individuale. Approfondendo tale aspetto e integrando i dati analitici con un'adeguata elaborazione statistica, sarebbe possibile individuare biomarkers correlati alla qualità, alla provenienza e all'autenticità del prodotto. Per esempio, questo lavoro ha definitivamente stabilito che il β -carotene è un carotenoide caratteristico del latte vaccino, così la sua identificazione potrebbe semplicemente e velocemente dirimere dubbi sull'uso fraudolento di tale latte durante la produzione della mozzarella di bufala.

Il Ministero dell'Agricoltura ha stimato che circa il 20% di tutti i formaggi esaminati nel 2000 è stato adulterato. Le frodi di maggior peso economico in questo settore, che risulta avere un fatturato di ben 13 miliardi di euro, sono dovute soprattutto alla contraffazione di formaggi di eccellenza che hanno ottenuto il riconoscimento comunitario di DOP (Denominazione di Origine Protetta) a cui appartiene anche la tanto rinomata mozzarella di bufala. Tra gli illeciti più frequentemente accertati per questo prodotto tutto italiano è stato evidenziato l'uso di latte bovino, che è circa tre volte meno costoso di quello bufalino. Negli ultimi anni si è diffuso un altro tipo di adulterazione che consiste nell'aggiunta di latte di pecora; quest'ultimo, pur essendo più costoso del latte bovino, possiede un gusto più simile al latte di bufala rispetto a quello di mucca. Inoltre, questo tipo di adulterazione è trasparente ai controlli sulle mozzarelle effettuati con i metodi ufficiali, rivolti all'esclusiva identificazione delle proteine del latte bovino.

Poiché i risultati conseguiti in questo lavoro, a seguito della caratterizzazione dei campioni di latte delle diverse specie animali, potrebbero essere utili per riscontrare possibili frodi alimentari, i metodi qui descritti potrebbero, dunque, rappresentare una valida alternativa alle

metodiche preesistenti, proponendosi come metodi semplici e rapidi per identificare la provenienza dei diversi prodotti.

4. BIBLIOGRAFIA

- [1] C. J. Blake, Status of Methodology for the Determination of Fat-Soluble Vitamins in Foods, Dietary Supplements, and Vitamin Premixes, *Journal of AOAC International*, 2007, VOL. 90, N. 4, 897-910.
- [2] M. Kamao, N. Tsugawa, Y. Suhara, A. Wada, T. Mori, K. Murata, R. Nishino, T. Ukita, K. Uenishi, K. Tanaka, T. Okano, *J. of Chrom. A*, 2007, 859, 192-200.
- [3] A. Gentili, F. Caretti, *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 684-697.
- [4] P. Salo-Väänänen, V. Ollilainen, P. Mattila, K. Lehtikoinen, E. Salmela-Mölsä, Vpiironen, *Food Chemistry*; 2000, 71, 535-543.
- [5] A. Escrivà, M. J. Esteve, R. Farrè, A. Frigola, *J. Chromatogr. A*; 2002, 947, 313-318.
- [6] P. J. M. Hulshof, T. van Roekel-Jansen, P. van de Bovenkamp, C. E. West., *J. Food Compos. Anal.*; 2006, 19, 67-75.
- [7] M. M. Delgado-Zamarreño, A. Sanchez-Perez, M. C. Gomez-Perez, J. Hernandez-Mendez, *J. Chromatogr. A*; 1995, 694, 399-406.
- [8] D. C. Woollard, H. Indyk, *J. Micronutr. Anal.*; 1989, 5, 35-52.
- [9] H. D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, *Food Chemistry* 4rd revised Edition, Springer Ed., 2009.
- [10] W. C. Byrdwell, J. De Vries, J. Exler, J. M. Harnly, J. M. Holden, M. F. Holick, B. W. Hollis, R. L. Horst, M. Lada, L. E. Lemar, K. Y. Patterson, K. M. Philips, M. T. Tarrago-Trani, W. R. Wolf, Analyzing vitamin D in foods and supplements: methodologic challenges, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, 88(suppl):554S-7S.
- [11] The world dairy situation 2007, *International Dairy Federation*, 2007, Bulletin 423/2007.
- [12] A. K. Hewavitharana, A. S. van Brakel, M. Harnett, *Int. Dairy J.* 1996, 6, 613-624.
- [13] M. G. Simic, Carotenoid free radicals, *Meth. Enzymol.*, 1992, 213, 444-453.
- [14] B. Suter, K. Grob, B. Picciarelli, *Z Lebensm Unters Forsch A*, 1997, 204, 252-258.
- [15] F. Calderón, G. Tornambé, B. Martin, P. Pradel, B. Chauveau-Duriot, P. Nozière, *Anim. Res.*, 2006, 55, 533-544.
- [16] G. Butler, J. H. Nielsen, T. Slots, C. Seal, M. D Eyre, R. Sanderson, C. Leifert, *J Sci Food Agric*, 2008, 88, 1431-1441.
- [17] P. Nozière, B. Graulet, A. Lucas, B. Martin, P. Grolier, M. Doreau, *Anim. Feed Sci. Tech.*, 2006, 131, 418-450.
- [18] P. Nozière, P. Grolier, D. Durand, A. Ferlay, P. Pradel, B. Martin, *J. Dairy Sci.*; 2006, 89, 2634-2648.

- [19] A. Fidanza, *Le Vitamine: Biochimica-Fisiologia-Nutrizione-Terapie*, Editrice Agnesotti, 1990, Roma.
- [20] P. Cappelli, V. Vannucchi, *Chimica degli alimenti: conservazione e trasformazione*, 2^o Ed., Zanichelli, 2000.
- [21] G. F. M Ball, *Vitamins in foods: analysis, bioavailability and stability*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2006.
- [22] McCance and Widdowson, Food Standards Agency, *The Composition of Foods*, 6th summary ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2002.
- [23] G. F. Senyk, W. F. Shipe, *Dairy Field*; 1981, 164, 81.
- [24] G. Panfili, P. Manzi, L. Pizzoferrato, *J. Dairy Res.*, 1998, 65, 253.
- [25] C. Vidal-Valverde, R. Ruiz, A. Medrano, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1992, 195, 562.
- [26] D. C. Woollard, H. Indyk, *J. Micronutr. Anal.*, 1986, 2, 125.
- [27] S. Albalà-Hurtado, M. T. Veciana-Nogues, E. Riera-Valls, A. Marine-Font, M. C. Vidal-Carou, *J. Dairy Res.*; 2000, 67, 225.
- [28] D. C. Woollard, A. D. Edmiston, *J. Dairy Sci. Technol.*, 1983, 18, 21.
- [29] B. L. T. Lau, Y. Kakuda, D. R. Arnott, *J. Dairy Sci.*; 1986, 69, 2052.
- [30] D. H. Cox, S. T. Coulter, W. O. Lundberg, *J. Dairy Sci.*, 1957, 40, 564.
- [31] I. Le Maguer, H. Jackson, *J. Dairy Sci.*, 1983, 66, 2452.
- [32] S. Nakai, G. Amantea, K. Eugster, L. Jung, C. Y. Ma, E. K. Nilsson, K. Suyama, *Can. Inst. Food Sci. Technol.*, 1983, 16, 116.
- [33] D. B Rodriguez-Amaya, M. Kimura, HarvestPlus Handbook for carotenoid analysis Technical Monograph 2.
http://www.dfid.gov.uk/R4D/PDF/Outputs/Misc_Crop/tech02.pdf. (Accessed 22 June 2012).
- [34] G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, *Carotenoids: Isolation and Analysis*, 1995, Vol.1A, Birkhauser, Basel.
- [35] F. Mo, X-ray crystallographic studies. *Carotenoids: Spectroscopy*, G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Vol.1B, 321-312. Birkhauser, Basel.
- [36] G. Britton, *The FASEB Journal*, 1995, 9, 1552-1558.
- [37] H. A. Frank, R. J. Cogdell, The photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis, *Carotenoids in Photosynthesis*, 252-326, Chapman and Hall, London, 1993.
- [38] J. Lafferty, T. G. Truscott, E. J. Land, Electron transfer reactions involving chlorophylls a and b and carotenoids, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1978, 174, 2760-2762.

- [39] N. I. Krinsky, Membrane Antioxidants, *Ann.N.Y.Acad.Sci*, 1988, 551, 17-33.
- [40] L. Feltl, V. Pacakova, K. Stulik, K. Volka, Reliability of Carotenoid Analyses: a review, *Current Analytical Chemistry*, 2005, 1, 93-102.
- [41] L. Villard, C. J. Bates, *Br. J. Nutr.*, 1986, 56, 115.
- [42] T. van Vliet, F. van Schaik, *Voedin*, 1992, 53, 186.
- [43] D. S. Deshmukh, J. Ganguly, *Ind. J. Biochem.*, 1964, 1,204.
- [44] A. During, A. Nagao, J. Terao, *J. Nutr.*, 128, 1614.
- [45] D. M. Deming, A. C. Boileau, C. M. Lee, J.W. Erdman, *J. Nutr.*, 2000, 130, 2789.
- [46] Institute of Medicine, *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*, National Academy Press, Washington, D.C., 2001.
- [47] A. Meregalli, A. Giorgetti, A. Martini, R. Bozzi, *Fondamenti di anatomia, fisiologia e zoo gnostica*, Editrice Liviana, 2006.
- [48] AGRARIA.ORG – RIVISTA N. 150 - agosto 2012.
- [49] M. C. Herrero-Barbudo, F. Granado-Lorencio, I. Blanco-Navarro, B. Olmedilla-Alonso, *Int.Dairy J.*, 2005, 15, 521-526.
- [50] D. B. Gomis, M. P. Fernández, M. D. Gutiérrez Alvarez, *J. Chromatogr. A*, 2000, 891, 109-114.
- [51] B. Rodas Mendoza, S. Morera Pons, A. I. Castellote Bargallò, M. C. Lòpez-Sabater, *J. Chromatogr. A*, 2003, 1018, 197-202.
- [52] D. Blanco, M. P. Fernandez, M. D. Gutierrez, *Analyst*, 2000, 125, 427-431.
- [53] E. Jakob, I. Elmadfa, *Food Chem.*, 1995, 5687-5691.
- [54] A. Kalman, C. Mujahid, P. Mottier, O. Heudi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, 17, 723-727.
- [55] B. D. Gill, H. E. Indyk, *J.Dairy Int.*, 2008, 18, 894-898.
- [56] M. S. Havemose, M. R. Weisbjerga, W. L. P. Bredieb, J.H. Nielsena, *Int.Dairy J.*, 2004, 14, 563–570.
- [57] O. Heudi, M. J. Trisconi, C. J. Blake, *J. Chromatogr. A*, 2004, 1022, 115-123.
- [58] H. E. Indyk, D. C. Wollard, *Analyst*, 1997, 122, 465-469.
- [59] C. Turner, M. Persson, L. Mathiasson, P. Adlercreutz, J. W. King, *Enzyme Microb. Tech.*, 2001, 29, 111-121.
- [60] D. C. Woollard, H. E. Indyk, B. Y. Fong, K. K. Cook, *J. AOAC Int.*, 2002, 85, N. 3.
- [61] L. C. Sander, K. E. Sharpless, N. E. Craft, S. A. Wise, *Anal. Chem.*, 1994, 66, 1667.

- [62] J. Oliver, A. Palou, Review : Chromatographic determination of carotenoids in foods, *J. Chromatogr. A*, 2000, 881, 543–555.
- [63] S. C. Coverly, R. Macrae, *J. Micronutr. Anal.*, 1989, 5, 15.
- [64] G. W. C. Hung, *J. Liq. Chromatogr.*, 1988, 11, 953.
- [65] J. J. Bekhof, J. W. Van den Bedem, *Neth. Milk Dairy J.*, 1988, 42, 423.
- [66] V. K. Agarwal, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1988, 71, 19.
- [67] B. Tan, L. Brzuskiwicz, *Anal. Biochem.*, 1989, 180, 368.
- [68] M. C. Lopez Sabater, A. Agramont Llinas, J. Boatella Riera, *Alimentaria*, 1986, 173,37.
- [69] N. K. Andrikopoulos, M. N. Hassapidou, *J.Sci. Food Agric.*, 1989, 46, 503.
- [70] C. J. Hogarty, C. Ang, R. R. Eitenmiller, *J.Food Composit. Anal.*, 1989, 2, 200.
- [71] H. E. Indyk, *Analyst*, 1990, 115, 1525.
- [72] L. M. Marero, E. M. Payumo, A. R. Aguinaldo, S. Homma, O. Igarashi, *J.Food Sci.*, 1991, 56, 270.
- [73] T. Sakano, S. Notsumoto, T. Nagaoka, *Vitamins*, 1988, 62, 393.
- [74] M. Careri, F. Bianchi, C. Corradini, Review: Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis, *J. Chromatogr. A*, 2002, 970, 3–64.
- [75] S. A. Barnett, L. W. Frick, H. M. Baine, *Anal. Chem.*, 1980, 52, 610-614.
- [76] L. Sowell, D. L. Huff, P. R. Yeager, S. P. Caudill, E. W. Gunter, 1994, *Clin. Chem.*, 40, 411-416.
- [77] D. D. Bankson, R. M. Russell, J. A. Sadowski, *Clin. Chem.*, 1986, 32, 35-40.
- [78] J. D. Ribaya-Mercado, J. G. Fox, W. D. Rosenblad, M. C. Blanco, R. M. Russel, *J. Nutr.*, 1992, 122, 1898-1903.
- [79] C. K. Schmidt, A. Brouwer, H. Nau, *Anal. Biochem.*, 2003, 315, 36-48.
- [80] M. A. Kane, A. E. Folias, J. L. Napoli, *Anal. Biochem.*, 2008, 378, 71-79.
- [81] M. G. M. de Ruyter, A. P. De Leenheer, *Anal. Chem.*, 1979, 51, 43-46.
- [82] M. G. M. de Ruyter, A. P. De Leenheer, *Clin. Chem.*, 1978, 24, 1920-1923.
- [83] M. Orth, M. Hanisch, G. Kroning, M. Porsch-Ozcurumenez, H. Wieland, C. Luley, *Clin. Chem.*, 1998, 44, 1459-1465.
- [84] R.B. van Breemen, D. Nikolic, X. Xu, Y. Xiong, M. van Lieshout, C. E. West, A. B. Schilling, *J. Chromatogr. A*, 1998, 794, 245-251.
- [85] L. Urbanek, L. Kromova, D. Solichova, B. Melichar, V. Opletalova, P. Solich, *J. Sep. Sci.*, 2006, 29, 2485-2493.
- [86] S. Hartmann, O. Froescheis, F. Ringenbach, R. Wyss, F. Brucheli, S. Bischof, J. Bausch, U. W. Wiegand, *J. Chromatogr. B*, 2001,751, 265-275.

- [87] A.B. Barua, J. A. Olson, *J. Chromatogr. B*, 1998, 707, 69-79.
- [88] D. Majchrzak, E. Fabian, I. Elmadfa, *Food Chemistry*, 2006, 98, 704-710.
- [89] H. C. Furr, A. J. Clifford, L. M. Smith, J. A. Olson, *J. Nutr.*, 1989, 119, 581-585.
- [90] L. Roed, E. Lundanes, T. Greibrokk, *J. Chromatogr. A*; 2000, 890, 347-353.
- [91] T. Wingerath, D. Kirsch, B. Spengler, R. Kaufmann, W. Stahl, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 3855-3860.
- [92] M. W. Schaffer, S. S. Roy, S. Mukherjee, D. Nohr, M. Wolter, H. K. Biesalski, D. E. Ong, S. K. Das, *Anal. Methods*, 2010, 2, 1320-1332.
- [93] M.-J. Suh, X.-H. Tang, L. J. Gudas, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 5719-5728.
- [94] A.B. Roberts, M. D. Nichols, C. A. Frolik, D. L. Newton, M. B. Sporn, *Cancer Res.*, 1978, 38, 3327-3332.
- [95] H. S. Huang, D. S. Goodman, *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 2839-2844.
- [96] B. Ahluwalia, R.T. Holman, *Lipids*, 1966, 1, 197-201.
- [97] J. E. Paanakker, G. W. T. Groenendijk, *J. Chromatogr.*, 1979, 168, 125-132.
- [98] L. Got, T. Gousson, E. Delacoux, *J. Chromatogr. B*, 1995, 668, 233-239.
- [99] A. C. Ross, *Method Enzymol.*, 1986, 123, 68-74.
- [100] L. Roed, E. Lundanes, T. Greibrokk, *Electrophoresis*, 1999, 20, 2373-2378.
- [101] R. B. van Breemen, C.-R. Huang, *FASEB J.*, 1996, 10, 1098-1101.
- [102] S. L. Reynolds, H. J. Judd, *Analyst*, 1984, 109, 489-492.
- [103] R. B. Van Breemen, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 229A-304A.
- [104] L. F. Fieser, *J. Org. Chem.*, 1950, 15, 930-943.
- [105] M. L. Gross, 2000, *Int. J. Mass Spectrom.*, 200, 611-624.
- [106] M. Jemal, *Biomed. Chromatogr.*, 2000, 14, 422-429.
- [107] R. K. Boyd, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 1993, 7, 257-271.
- [108] M. M. Mendes-Pinto, A. C. S. Ferreira, M. B. P. P Oliveira, P. G. De Pinho, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 3182-3188.
- [109] B. S. Inbaraj, H. Lu, C. F. Hung, W. B. Wu, C. L. Lin, B. H. Chen, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 2008, 47, 812-818.
- [110] S. Prache, A. Priolo, P. Grolier, *J. Anim Sci.*, 2003, 81, 360-367.
- [111] S. Perales, A. Alegria, R. Barberà, R. Farrè, *Food Sci. Technol. Int.*, 2005, 11, 451-462.
- [112] J. Jakobsen, E. Saxholt, *J. Food Compos. Anal.*, 2009, 22, 472-478.
- [113] P. Mattila, V. Piironen, E. J. Uusi-Rauva, P. E. Koivistoinen, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43, 2394-2399.

*E' vero che il centro di gravità è dentro di noi ma è vero anche che quando si
perde di vista l'orizzonte sono i punti fermi che ci salvano.*